Vol. IV Luglio-Agosto 1932 - A. X Fasc. VII-VIII

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

BOLLETTINO

DELLA

SEZIONE ITALIANA

SOMMAIRE

Avvertenze ai Soci 188

De' Rossi G. — La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. — I.er Isolement et dénombrement des « Azotobacters » . . 189

Gorrieri I. — Sur la différentiation du groupe colibacillaire . 197

Gorrieri I. — A propos de quelques perfectionnements dans la technique de l'épreuve de Voges-Proskauer pour l'étude du groupe coli-aërogenes . . . 199

Mucci D. — Hémolysines et agglutinines dans l'abcès de fixation. Note 203

Jona A. — Le mécanisme d'action de la protéinothérapie . 205

Jona A. — Recherches sur l'électivité des tissus du staphylocoque 208

Pozzi L. — Recherches histologiques comparatives a propos des altérations déterminées par des bacilles tuberculeux vivants et morts 210

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE ITALIANA

Segue ELENCO DEGLI ADERENTI

342. – Berni dott. Angelo - Laboratorio Medico Micrografico Provinciale, *Terni*.
343. – Mammozzi Zorini dott. Lorenzo - R. Istituto Superiore Agrario, *Firenze*.

IV° CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

Si avvertono i Soci che l'annunciato Congresso della nostra Sezione avrà luogo in Milano presso l'Istituto Sieroterapico Milanese nei giorni 3, 4 e 5 di Ottobre.

È intendimento del Comitato di distribuire agli iscritti al Congresso almeno una decina di giorni prima del Congresso il testo delle Relazioni e delle Comunicazioni, onde permettere la più ampia discussione durante le sedute.

Rammentiamo perciò agli interessati che il termine ultimo per la presentazione delle Comunicazioni è il 31 Agosto corrente.

DE' ROSSI G. – **La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. – I^er^ Isolement et dénombrement des " Azotobacters ".**

Les culteurs de la Microbiologie du sol ont laissé de côté (pour le moment au moins) toute tentative d'une méthode générale d'analyse satisfaisant ou, du moins, ils ont restreint leur activité en ce champ à des essais, plus ou moins heureux, des méthodes d'examen microscopique; et depuis longtemps ils se sont occupés de l'étude des moyens de recherche des différents groupes microbiens.

Mais, même les procédés qui avaient été ainsi proposés — depuis les méthodes d'isolement moyennant une culture d'enrichissement, jusque aux déterminations quantitatives par délayement progressif en des liquides électifs, depuis l'essai des activités microbiennes dans les solutions nutritives ensemencées avec de la terre, jusqu'à l'évaluation des modifications chimiques qu'on peut remarquer dans la terre mêlée de substances adaptes à favoriser le développement de microrganismes donnés, ou de groupes de microrganismes — ont déjà donné tout ce qu'ils pouvaient donner, et tous les chercheurs, ou presque tous, sont aujourd'hui d'avis que ces procédés ne pouvaient pas donner beaucoup.

Tout le monde pense qu'un progrès ultérieur et très souhaité de nos connaissances, pour ce qui se rapporte à la microbiologie du sol, ne sera point possible sans des modifications substantielles dans les relatives méthodes d'investigation.

Les dernières recherches de M. Winogradsky (1) ont justement excité un grand intérêt: elles ont amené, par ex., un progrès remarquable dans l'étude des microbes fixateurs de l'azote non symbiotiques. Et, par là, je ne veux pas me rapporter à la méthode de recherche microscopique décrite par M. Winogradsky, qui n'est autre chose qu'une modification des méthodes précédentes et qui, de même que toutes les méthodes précédentes et successives, ne peut avoir d'autre valeur que celui d'une simple recherche d'orientation; je ne veux pas de même faire allusion à ce qu'on appelle la méthode des moulages, qui promet toutefois des applications intéressantes pour la détermination microbiologique de quelques caractères chimiques du sol. Mais je trouve qu'on doit surtout rattacher une importance particulière à la partie des nouvelles recherches de M. Winogradsky, qui se rapporte à la méthode de culture des Azotobacters sur les plaques de silice: au moyen de cette méthode les microrganismes peuvent être cultivés du terrein, directement et très facilement, et on peut en évaluer le nombre avec une précision bien supérieure à celle qui était

(1) WINOGRADSKY: Annales de l'Institut Pasteur, 1925-1926-1928-1932.

particulière aux très imparfaites méthodes de dénombrement par délayement, auxquelles on devait nécessairement recourir jusqu'ici.

Cette méthode peut être résumée ainsi, suivant la description que M. Winogradsky en a donnée:

On mélange une solution de silicate de sodium pure et incolore, délayée jusqu'à 9° B environ, avec de l'acide chlorhydrique délayé à 13° B, en parties égales, en versant le silicate dans l'acide. Ensuite on verse en des boîtes de Petri, au diamètre de 10 cm., 30 cmc. de ce mélange. On attend 24 heures au moins, jusqu'à ce que le gel soit devenu bien solide et vibrant à la percussion des boîtes. Ces dernières sont alors rincées à l'eau courante pendant deux ou trois jours; puis on les soumet à des lavages répétés, moyennant l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que l'eau du lavage n'est plus troublée par suite de l'addition de nitrate d'argent. On devra alors imprégner le *substratum* à l'aide d'une solution nutritive appropriée. Celle-ci est constituée par: Eau distillée 200 + Phosphate monopotassique 1 + Sulphate de magnesium 0,5 + Chlorure de Sodium 0,5 + Sulphate ferreux 0,02 + Sulphate de manganèse 0,02. M. Winogradsky conseille de prendre pour chaque plaque 2 cmc. de ce liquide, d'y ajouter 2 ou 3 cgr. de carbonate de calcium en poudre et 0 gr. 5 de mannite. On ramène le pH du mélange à 6,8-7,2 moyennant l'addition d'une solution de potasse au 2%; on y ajoute un peu d'eau distillée, on fait bouillir et l'on verse le liquide bouillant sur la plaque. On porte cette dernière à évaporation à 55° environ, jusqu'à la disparition totale du liquide. Pour l'ensemencement on emploie les grains de terre obtenus en passant l'échantillon desséché à l'air, par un tamis aux mailles très petites. On dispose 50 grains sur la surface d'une plaque au diamètre de 10 cm. et une quantité plus grande sur les plaques plus larges. Au bout de 48 heures, à la température de 28-30°, les colonies des Azotobacters apparaissent sous la forme de petits disques muqueux, plus ou moins bombés, ayant pour centre un grain de terre et atteignant, et même surpassant bientôt, ½ cm. de diamètre; en général ces colonies constituent la seule végétation importante sur plaque.

Ma longue pratique de laboratoire me permet d'affirmer que cette méthode de culture pour les Azotobacters, a une valeur fort remarquable, mais j'ai constaté que sa technique aurait pu être utilement modifiée. À ce propos j'ai pris en considération notamment deux points; c'est-à-dire j'ai étudié:

a) s'il n'y avait pas moyen de remplacer le silico-gel par un autre substratum aussi approprié, mais demandant une préparation plus simple et plus rapide;

b) si au lieu de l'ensemencement des grains de terre il n'était plus

convenable d'adopter la méthode ordinaire par laquelle on étale sur la surface du *substratum* des quantités déterminées de suspensions de terre en des liquides indifférents.

Naturellement, ces possibilités n'avaient pas échappé à M. Winogradsky qui, d'ailleurs, a voulu les exclure, en se basant sur des arguments la valeur desquels ne m'a semblé pourtant pas — soit *a priori*, soit à l'épreuve des faits — trop remarquable. Par exemple, pour ce qui se rapporte au choix du *substratum* nutritif, W. affirme que seulement un gel minéral — savoir le gel silicique — peut utilement servir; il ne pourrait pas être remplacé par l'agar, qui n'est pas un simple véhicule, mais un aliment lui-même. C'est bien; mais on aurait pu rechercher toutefois si réellement il n'était pas possible de préparer un *substratum* à base d'agar, suffisamment sélectif pour les Azotobacters.

Je crois bon de ne pas toucher ici aux nombreuses tentatives que j'ai faites à ce propos; je me bornerai à dire que les mélanges d'agar simple (15 parties d'agar délayées en 1000 parties d'eau) avec de différentes proportions de terre (de 20 à 80%) et de mannite (1-5%) stérilisés à l'autoclave, au lieu d'être propres à la sélection des Azotobacters, se sont montrés tellement favorables au développement de toute sorte d'autres microbes du sol, que j'ai été amené à penser que, peut-être, ne serait-il pas inutile de les prendre nouvellement en considération à ce point de vue. En partant toujours de la supposition que la présence de la terre, représentée dans la méthode de W., par les grains utilisés comme matériel à inoculation, aurait pu être utile pour le développement des Azotobacters, j'ai fait aussi de différentes épreuves, dans lesquelles, employant comme supports la silice ou l'agar simple à l' 1,5%, je les imprégnais du liquide nutritif préparé d'après les indications de W., mais en y ajoutant 0,5-1 gramme de terre très fine (passé par le tamis de ½ mm.).

Bien entendu, dans ce cas je ne pouvais pas me borner à fair bouillir brièvement le mélange avant de le verser sur les plaques, mais je devais le soumettre à la stérilisation (une heure et demie dans l'etuve de Koch), pour tuer les microbes renfermés au sein de la terre. Par ce procédé il se forme, sur la surface des plaques desséchées, une couche légère et parfaitement lisse de terre, sur laquelle les colonies des Azotobacters poussent fort vigoureusement en présentant les très évidents caractères différentiels de chaque espèce (structure, consistance, pigmentation, etc.). Je crois pourtant que les *substratums* préparés de la sorte pourront être utilement appliqués pour l'étude des Azotobacters. Mais, pour ce qui se rattache à l'isolement de ces microbes du terrein, et à leur évaluation, je dois avertir sans plus que l'agar simple sans aucune autre addition que celle de la solution nutritive de Winogradsky, corresponde parfaitement au but.

Tout d'abord, en tenant compte du fait que ce *substratum* doit contenir des quantités sensibles de substance organique, j'avais même estimé bon de le soumettre à un long lavage à l'eau, selon la méthode bien connue de Beijerinck (1); mais j'ai dû constater bientôt que cette complication du procédé n'apportait aucun avantage réel.

Pour ce qui en est au liquide nutritif, je ne doute point que celui proposé par W. ne corrisponde parfaitement au but, soit lorsqu'il est ajouté aux plaques de silice, soit lorsqu'on l'emploie avec celles d'agar. Dans son plus récent mémoire, M. Winogradsky propose de remplacer, comme matériel énergétique, la mannite par le benzoate de sodium (gr. 0,1 pour chaque plaque); de cette façon, le développement des colonies est beaucoup ralenti, elles sont plus compactes, moins muqueuses, moins diffluentes, de sorte que leur dénombrement est plus facile et plus exacte. Cela va se vérifier sans doute quand l'ensemencement des plaques est fait à l'aide des grains de terre trop rapprochés; mais si le matériel à inoculation est constitué par la suspension de terre opportunément délayée, on ne voit pas quel avantage pourrait on tirer, en entrâvant le développement des colonies. Au cours des épreuves que j'ai accomplies, les plaques de silice au benzoate ont toujours donné des colonies très petites et parfois un développement tout à fait négatif; employant l'agar on a généralement obtenu des résultats assez satisfaisants, mais toujours inférieurs aux résultats donnés par la mannite qui, d'après mon avis, est de beaucoup plus à préférer comme matériel énergétique activant la végétation des Azotobacters.

J'ai entrepris la recherche des Azotobacters sur 200 échantillons de terre au moins, en employant toujours parallèlement des plaques de silice et des plaques d'agar simple, imprégnées de liquide de Winogradsky mannité et en me mettant toujours en des conditions identiques par rapport à toutes les autres particularités de technique culturale. D'après une expérience si vaste, je suis maintenant à même d'établir que, tandis que l'agar simple mannité présente des avantages considérables pour la simplicité et la rapidité de sa préparation, il corresponde d'une manière du moins autant satisfaisante que la silice, pour la culture des Azotobacters. En effet, si je devais me rapporter strictement au résultat de mes recherches, je devrais même affirmer la supériorité de l'agar avec lequel j'ai obtenu en plusieurs cas, un développement d'Azotobacters, tandis que les plaques de silice restaient dépourvues ou pauvres en colonies. Mais je ne peux pas exclure que cela tenait d'une préparation imparfaite des plaques mêmes (par ex. d'un lavage incomplet, d'un dessèchement excessif), ce qui, évidemment ne peut pas infirmer la bonté de la méthode.

(1) Beijerinck: Centralblatt für Bakteriologie, II, 1896 (XIX).

L'emploi de l'agar pourrait préoccuper seulement par rapport au possible développement de microbes non appartenant au groupe des Azotobacters. Mais M. Winogradsky a constaté que non rarement, même sur la silice, il se développe à côté des colonies des Azotobacters, celles aussi de différents oligonitrophiles et notamment les colonies bombées, brillantes, très épaisses, gommeuses, propres à un bacille aux extrémités arrondies des colonies pareillement bacillaires, ayant l'aspect de petites gouttelettes hyalines, et enfin les colonies d'un *Coccus*, qui se présentent comme des gouttelettes plates, hyalines et aqueuses. Or, ce sont précisément ces colonies que l'on observe parfois même sur les plaques d'agar; elles ont un aspect identique, mais il n'y a pas lieu à aucune confusion entre celles-ci et les colonies des Azotobacters, comme nous allons dire plus loin.

A présent, en venant à la deuxième des particularités de technique culturale susmentionnées, adoptées par W., c'est-à-dire à l'emploi des grains de terre comme matériel pour l'inoculation des plaques, voici ce que dit M. Winogradsky à ce propos: « La manière d'inoculer le gel avec de la terre n'est pas indifférente. Le procédé usité est, comme on le sait, de préparer des suspensions plus ou moins diluées, dont on inocule une goutte dans la masse fondue, ou qu'on étale sur la surface solidifiée, pour que les germes, écartés, puissent se mettre en train sans se gener mutuellement. Or, ce procédé n'est bon que quand il s'agit de faire apparaître des colonies quelconques pour les dénombrer. Mais quand on veut opérer une sélection, il est au contraire préférable de ne pas écarter les germes, ni de délayer la terre, mais de la déposer comme elle est, en grains naturels. On laisse ainsi libre jeu aux compétitions microbiennes, et le résultat est que le « grain » s'entoure de végétations du microbe spécifique qui devance et qui étouffe toute pullulation des germes qui ne trouvent pas leur conjoncture physiologique dans les conditions données. Une colonie se forme très rapidement ayant le grain pour centre, et en l'examinant au microscope on est frappé de ce qu'elle présente d'un coup une uniformité et une pureté qui ne laissent rien à désirer ».

A vrai dire, je ne pourrais confirmer sans plus ces affirmations. Je pense que quand on prépare des cultures sur plaque, soit qu'elles doivent être usitées pour des évaluations microbiennes, soit pour l'isolement de différentes espèces existant dans un milieu donné, soit enfin pour favoriser le développement d'une certaine espèce aux dépens des autres, le résultat à atteindre doit être celui d'obtenir des colonies dont chacune dérive du développement d'une seule cellule ou d'un groupement de cellules de la même espèce. On tâche d'atteindre ce but en tant qu'il est possible, au moyen de la méthode, généralement employée, des suspensions de terre, tandis qu'en utilisant les grains on se met, à propos,

en des conditions tout à fait différentes. M. Winogradsky n'admet pas que les grains de terre favorisent, par eux-mêmes, la formation de colonies d'Azotobacters, et il suffit d'ensemencer une plaque moyennant la suspension de terre, pour se convaincre que, même en ce cas, les colonies vont se mettre en train fort vigoureusement dans les *substratums* appropriés. Il est vrai que le pouvoir de sélection du liquide de W. sur les Azotobacters excite leur activité végétative à un tel point qu'en général, ils vont avoir une prédominance sur les autres microbes qui les accompagnent dans le terrein, et quand on observe les encore petites colonies entourant les grains de terre, à l'aide des préparés « par impression » colorés, on voit habituellement un tableau vraiment frappant au point de vue de l'apparente pureté de la végétation. Mais M. Winogradsky reconnaît que souvent cette pureté n'est qu'apparente: déjà dans les colonies mêmes, très développées, ou sinon dans les successifs passages culturaux, on constate très facilement l'apparition de microbes souillants que, tout d'abord, on n'aurait pas aperçus. Il semblerait donc opportun d'essayer, si possible, de dissocier les cellules appartenant aux Azotobacters, des autres microbes assûrément adhérents aux particules de terre. Tout cela sera plus ou moins facile à appliquer, ou, pour mieux dire, on pourra l'obtenir d'une façon plus ou moins complète; mais pourquoi devrions nous y renoncer sans plus, en partant, pour la production des colonies, d'un matériel certainement impur?

Il n'est pas convenable de se servir des grains surtout dans les déterminations quantitatives des Azotobacters dont la valeur est évidemment très modeste quand l'on ignore totalement si les colonies dénombrées sur les plaques originent d'une seule cellule adhérente à un grain, ou d'un groupement cellulaire plus ou moins nombreux. Je sais parfaitement que d'après W., les Azotobacters se trouvent au sein de la terre, *groupés en petites colonies dont on ne pourrait pas dissocier les éléments cellulaires* moyennant une suspension et une agitation prolongée dans l'eau, car l'adhésion de ces éléments est excessivement ténace. Cependant, par suite d'une longue série de considérations et d'observations expérimentales (que je vais exposer dans une Note prochaine), faites par moi-même et par d'autres AA., je suis enclin à penser que, peut-être, cette opinion n'est pas tout à fait exacte. Certes, la méthode de l'ensemencement des plaques à l'aide des suspensions de terre opportunément délayées, m'a donné les résultats les plus satisfaisants au point de vue qualitatif (développement rapide de colonies bien écartées, ayant des caractères différentiels typiques, pureté fréquente des colonies mêmes, etc.); et, exception faite pour les terreins très pauvres en Azotobacters, elle m'a fourni des données numériques bien supérieurs à ceux qu'on obtient des plaques inoculées parallèlement au moyen des grains de terre. Enfin, lorsqu'il

s'agit de dénombrer les Azotobacters dans un matériel où ils sont extrêmement nombreux — comme, par ex., les végétations culturales, la terre mannitée mise en incubation, etc. — on ne pourrait certainement pas remplacer par une autre méthode celle des suspensions progressivement délayées.

***

J'en finis en exposant ici la méthode que j'estime la plus appropriée pour l'isolement, le dénombrement et l'étude culturale des Azotobacters.

Elle est essentiellement la méthode de M. Winogradsky, mais avec quelques modifications qui, à mon avis, en rendent l'application plus simple et plus rapide, tandis que les résultats en sont plus exacts et plus sûrs.

1) *Préparation du substratum nutritif.* — L'on additionne à de l'eau de source commune l' 1,5% d'agar finement haché; on rechauffe à la flamme directe et on fait bouillir pendant 15 minutes. Le liquide tout chaud est maintenant versé dans de petits ballons de la capacité d'environ 300-350 cmc.; chacun de ces ballons pourra être utilisée ensuite pour la préparation de 10-12 plaques. Les récipients (dont le goulot aura été bouché avec de l'ouate et protégé avec du papier parcheminé) seront immédiatement portés dans l'étuve de Koch préalablement chauffée à 100°; il y resteront pendant trois heures; on obtiendra, en même temps, la cuisson et la sûre stérilisation de l'agar, qui se maintiendra, pendant beaucoup de temps, approprié à l'usage. On en verse alors 25-30 cmc. dans les boîtes de Petri au diamètre de 9-10 cm. Après solidification, on doit y ajouter le liquide nutritif. Un volume donné de la solution indiquée par Winogradsky (Eau distillée 1000, Phosphate monopotassique 5, Sulphate de magnesium 2,5; Chlorure de sodium 2,5; Sulphate ferreux 0,1; Sulphate de manganèse 0,1; ajouter une solution de potassium au 2% jusqu'à ramener la réaction au pH = 7 environ) est additionné d'un égal volume d'eau distillée; à ce mélange on ajoute encore le 12% de mannite et le 5% de carbonate de calcium en poudre. On fait bouillir pendant 3 minutes, après quoi l'on porte sur chaque plaque, à l'aide d'une pipette jaugée (en agitant bien chaque fois afin de maintenir le carbonate en suspension) 4 cmc. du liquide. Il faut que les capsules restent découvertes au thermostate à 37° ou mieux encore dans une étuve rechauffée à 45°, jusqu'à ce que la surface de l'agar n'apparaît pas bien sèche; cela exigera plusieurs heures de séjour à 37° et un intervalle plus court à 45°, mais en tout cas cela n'apportera, d'habitude, aucune souillure.

2) *Préparation des cultures.* — Je vais me rapporter au cas plus complet, c'est-à-dire au cas de la valutation quantitative des Azoto-

bacters. On stérilise (une heure dans l'etuve de Koch) dans une bouteille de verre au bouchon dépoli, ayant une capacité de 500 cmc., 400 cmc. d'eau de source commune; il ne faut pas employer de l'eau distillée comme liquide de dilution et il est parfaitement inutile de se servir de la solution physiologique de chlorure de sodium. On ajoute 5 gr. de terre ayant son taux normal d'humidité; elle sera ensuite dosée dans un autre échantillon pareil, àfin de pouvoir rapporter les résultats à un poids sec déterminé. On agite énergiquement durant 10 minutes, et puis encore 7 ou 8 fois pour une minute environ, dans le cours d'une demie heure. Quand il s'agit d'analyser des terreins agraires normaux où l'on sait que la quantité des Azotobacters n'est jamais trop élevée, il suffira, partant de cette première dilution à 1/80, d'en préparer une deuxième à 1/800, en en plaçant 40 cmc. dans une bouteille égale à la précédente et contenant aussi 360 cmc. d'eau de source stérilisée. Mais si l'on veut dénombrer les Azotobacters dans une culture ou dans un terrein où l'on ait provoqué artificiellement la multiplication, il faudra préparer suivant le même système, deux autres dilutions à 1/80000 et 1/800000. Moyennant des pipettes jaugées et stérilisées on étale sur la surface d'autant de capsules déjà préparées, 0,7 cmc. de chaque dilution; cette quantité de liquide suffit à humecter uniformement la surface du *substratum*, surtout si l'on en favorise l'étendue, en inclinant les capsules en toutes les directions. On porte immédiatement ces capsules à l'étuve à 37° C. où elles restent découvertes et, en général, au bout d'une demie heure, l'excès de liquide est déjà évaporé, en laissant les cellules microbiennes diffusément fixées sur la surface de l'agar. On ferme alors les boîtes avec leur couvercle et on les place, renversées, dans le thermostate à la température d'environ 30°, qui est considérée comme la plus favorable pour le développement des Azotobacters.

3) *Examen des cultures.* — On doit le faire une première fois au bout de 48 heures; mais on doit le répéter même après 4 et 6 jours, soit pour se rendre compte de l'éventuelle apparition des colonies tardives, soit pour remarquer l'aspect le plus caractéristique de toutes les colonies développées, en évitant de la sorte toute possible confusion avec celles de germes n'appartenant pas au groupe des Azotobacters. Ainsi que nous avons déjà dit, et tout à fait concordement à ce qui fut observé par M. Winogradsky dans les plaques de silice, même dans les cultures à l'agar on constate parfois un développement très précoce de petites colonies très humides, dont quelques unes ont un aspect de goutelettes aqueuses extrèmement minces, et quelques autres sont un peu bombées, constituées par un mucus blanchâtre très peu consistant: or, ces petites colonies ne se développent pas ultérieurement après la deuxième journée; au contraire, elles se dessèchent, d'habitude, assez rapidement et souvent lors de la

quatrième journée elles sont presque totalement disparues. Un autre type de colonies souillantes est représenté par de petits tas, au contour circulaire mais parfois même irrégulier, blancs, plus ou moins brillants, compactes, d'une consistance gommeuse, très difficiles à détacher du *substratum*. Pas de confusion possible entre ces colonies souillantes, dont l'apparition n'est, d'ailleurs, pas du tout fréquente, et les colonies des Azotobacters, surtout au cours des examens pratiqués après le quatrième jour, lorsque ces colonies ont assumé leur aspect si caractéristique, suivant les trois types reconnus par M. Winogradsky sur les plaques de silice, et précisément: 1) grosse goutte d'un mucus peu épais, à peine trouble (*colonies fluides*); 2) végétations sèches formant une membrane adhérente, blanche, rugeuse, rappelant un peu une mince couche de givre (*colonies sèches*); 3) mucus bombé, structuré, de la consistance d'empois d'amidon (*colonies bombées*). Ensuite d'autres différences surviennent qui s'accompagnent à l'apparition éventuelle de pigmentation diverses. A propos du dénombrement des colonies, de leur transplantation et de l'étude ultérieure des cultures, il n'y a rien de particulier à remarquer; pour tout cela on se sert des règles ordinaires de la technique microbiologique.

Laboratoire de Microbiologie Agricole et Technique - Institut Royale Supérieur Agricole de Perouse.

GORRIERI I. – **Sur la différentiation du groupe colibacillaire.**

Les caractères fondamentaux qui sertent à individualiser le grand groupe *coli-aërogenes* (Neri, 1915-18-30) sont les suivants: forme bacillaire aux dimensions *maxima* de 0,7 × 5 microns, Gram-négative, asporogène, avec *optimum* de température de développement d'environ 37° C, ne fondant pas la gélatine, fermentant le glucose avec formation constante de gaz et d'acides, fermentant le lactose avec formation constante d'acides et formation presque constante de gaz.

Plusieurs rechercheurs, les américains et les anglais surtout, ont distingué dans ce groupe deux sous-groupes: l'un qui représente la flore intestinale de l'homme et des vertébrés en général, dénommé *Escherichia*; l'autre, l'*Aërobacter* qui est un saprophyte très répandu dans le monde extérieur, quoique on le trouve même dans l'intestin de l'homme et des autres vertébrés.

Ces deux groupes secondaires se différencient par des caractères culturaux et biologiques particuliers.

Parmi les divers procédés adoptés pour arriver à cette différentiation,

je rappellerai ici: le milieu de Koser, les épreuves du méthyl-rouge et de Voges-Proskauer dont je vais parler sous peu.

J'ai estimé qu'il aurait été assez intéressant d'étudier les deux variétés susdites, par rapport à leur provenance, dans cinquante souches isolées par moi-même, adoptant le procédé de Neri (ensemencement en bouillon Liebig-Peptone lactosé au rouge-phénol).

Des souches en question, 19 proviennent des eaux superficielles, 27 des fèces et de l'urine, 4 du lait. Pour différencier les deux genres *Escherichia* et *Aërobacter*, j'ai adopté les trois procédés mentionnés plus haut: le milieu de Koser, l'épreuve de Voges-Proskauser, et la réaction au méthyl-rouge.

Le milieu de Koser est constitué comme suit: eau distillée, chlorure de sodium, sulphate de magnesium, phosphate bi-ammonique; phosphate bi-potassique; citrate de sodium; dans ce milieu l'*Escherichia* ne se développe pas, tandis que l'*Aërobacter* se développe en troublant le milieu même. D'après Clark et Lubs, soit pour l'épreuve du méthyl-rouge soit pour la Voges-Proskauer, il faut ensemencer les différentes souches dans un milieu contenant le 0,5% de glucose, le 0,5% de peptone Witte et le 0,5% de phosphate bi-sodique. Après 48 heures de thermostate à 37° C pour la première épreuve, les tubes sont additionnés de 0,1 cmc. d'une solution hydro-alcoolique de méthyl-rouge (zone de virage du rouge au jaune pH 4,4-6). Dans les cultures d'*Escherichia* l'indicateur prend une belle couleur rouge brillante; dans celles d'*Aërobacter* on constate une couleur jaune. L'épreuve de Voges-Proskauer demande, du moins suivant la méthode classique, environ quatre jours pour le développement, après quoi on additionne les tubes d'un volume de potasse caustique, au 10%, correspondant au volume qui constitue le *substratum* nutritif, et on les place nouvellement au thermostate où ils restent pendant 12 heures. Les *Aërobacters* positifs montrent à la surface un anneau rouge-éosine qui, ensuite, gagne lentement toute la masse du liquide.

Des 50 souches étudiées, 5 seulement se sont comportées, au cours des trois réactions, avec les caractéristiques propres au genre *Aërobacter*, c'est-à-dire Koser-positives, méthyl-rouge-négatives, Voges-Proskauer-positives; 39, au contraire, ont donné les réactions caractéristiques de l'*Escherichia*, c'est-à-dire Voges-Proskauer, Koser-négatives, et méthyl-rouge-positives; 6 autres se sont comportées d'une façon tout à fait anomale, car deux d'entre-elles se sont montrées positives aux trois épreuves, une a été négative pour toutes les réactions, trois ont été Koser et méthyl-rouge-positives et Voges-Proskauer-négatives.

Il est intéressant, maintenant, d'examiner l'origine des cinq *coli* assûrément *Aërobacters*. De ces germes, deux proviennent des fèces, un de l'urine d'un malade atteint de cystite, deux autres de l'eau; tout

cela indique que l'*habitat* de l'*Aërobacter* est multiforme et que sa fréquence dans les selles a les mêmes proportions que dans le monde extérieur.

Or, que pouvons nous penser de ces souches qui se sont comportées d'une façon si anomale par rapport aux trois épreuves expérimentées, et comment pouvons nous les classer? D'après les résultats que nous venons de constater, on doit les exclure autant du genre *Aërobacter* que du genre *Escherichia*. Faut-il donc les éliminer du groupe des *coli* dont elles possèdent tous les caractères fondamentaux que nous avons énumérés au début de cette Note? Ou ne serait-il pas le cas de penser plutôt à des sous-groupes, en somme à des anneaux de conjonction entre les deux genres extrêmes susmentionnés? Je crois de pouvoir repondre affirmativement à cette dernière demande, surtout sur la base des recherches et des conclusions de plusieurs investigateurs qui, dans le grand groupe *coli-aërogenes* ont différencié des sous-groupes, en répartant aussi ces derniers en de nombreux types.

De ce qui précède on peut même déduire un corollaire pratique, c'est-à-dire qu'il n'est pas justifié de nier à la présence de l'*Aërobacter* dans les eaux la signification d'un indice de possible souillure, indice qui doit être donc étendu à tous les représentants du groupe *coli-aërogenes*.

Conclusions. — 1) L'*Aërobacter* ne trouve pas son *habitat* favorable seulement dans le monde extérieur, mais il le trouve aussi dans l'intestin de l'homme et des autres vertébrés.

2) Parmi les deux genres extrêmes — *Aërobacter* et *Escherichia* — ils existent des souches qui se comportent d'une façon anomale par rapport à quelques réactions et à certains caractères culturaux; ces souches peuvent être considérées comme un anneau de conjonction entre les deux genres en question.

Institut d'Hygiène de l'Université Royale de Florence.

GORRIERI I. – **A propos de quelques perfectionnements dans la technique de l'épreuve de Voges-Proskauer pour l'étude du groupe coli-aërogenes.**

Parmi les diverses méthodes pour différentier le *coli-Escherichia* de l'*Aërobacter* il existé l'épreuve dénommée « épreuve de Voges-Proskauser » à laquelle les deux AA. allemands sont parvenus en 1898, pourrait-on dire à l'improviste, en étudiant les caractères différentiels des germes des septicémies hémorragiques.

La méthode classique est pratiquée en ensemençant les différentes

souches coli-bacillaires dans un milieu synthétique; le milieu le plus usité c'est celui de Clark et Lubs contenant le 0,5% de glucose, le 0,5% de peptone Witte, le 0,5% de phosphate bisodique. Les tubes ensemencés sont gardés pendant quatre jours à 37°, après quoi on les additionne d'une égale quantité d'une solution de potasse caustique au 10% et on les porte nouvellement à l'étuve. Au bout de 12 heures on en fait la lecture. L'*Aërobacter* détermine dans le milieu une coloration rouge-éosine; l'*Escherichia* ne produit dans le *substratum* aucune réaction tinctoriale particulière.

Cette première méthode a été pourtant modifiée.

En effet une des variantes de la méthode même consiste en ce que les tubes ensemencés sont portés, au bout des quatre jours de thermostate et après l'addition de KHO, dans un bain-marie bouillant où ils restent pendant quelques minutes, après quoi on ajoute à chacun d'eux, deux gouttes d'eau oxygénée. La réaction rouge-éosine apparaît immédiatement, sans qu'il se rend nécessaire un successif séjour au thermostate.

Récemment (août 1930) M. C. H. Werkman, de la Station Expérimentale d'Agricolture de Jowa, a proposé une réaction au perchlorure de fer. Après trois-quatre jours de thermostate à 30°, il ajoute à chaque tube à culture deux gouttes d'une solution de perchlorure de fer au 2% et ensuite 5 cmc. d'hydrate de sodium au 10%. Il en fait un mélange. On voit alors se former assez tôt dans les tubes *Aërobacter*-positifs deux couches de coloration; la couche supérieure a une couleur cuivreuse; celle inférieure a la couleur de l'éosine. Pas de modifications pour l'*Escherichia*.

Au mois d'avril de cette année, M. Einar Leifson de l'Université de Baltimore, a proposé une autre modification à la méthode dont il est discours. Il se sert du réactif suivant: Un gramme de ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) est dissout en 40 cmc. d'ammoniaque (poids spécifiques 0,90). Cette solution est additionnée à 960 cmc. de NaOH avec une concentration non inférieure au 10% et ensuite on l'ajoute, en des proportions égales, au milieu de culture. À la présence de l'*Aërobacter* il se forme, au bout de 10'-20', sur la surface du *substratum*, un anneau rouge-brillant, qui n'est pas à confondre avec la coloration violacée qu'on peut voir indistinctement dans tous les tubes aussitôt le réactif est mélangé à la culture, et qui ensuite disparaît bientôt. Lorsqu'on agite les éprouvettes, le rouge brillant gagne toute la masse du liquide.

Je me suis appliqué à établir laquelle de ces quatres réactions est la plus pratique et la plus sensible, et c'est pourquoi, en utilisant 50 souches isolées par moi-même et assûrement contrôlées comme appartenant au groupe coli-bacillaire, j'ai commencé à faire un ensemencement moyennant le milieu de Clark et Lubs. J'ai donc pris un nombre de tubes tel à pouvoir pratiquer les réactions après 24, 36 e 48-50 heures de l'ensemence-

ment même. Je ne parlerai pas des réactions obtenues au bout de 24 et 36 heures, car, tout en se manifestant d'une manière assez évidente, elles ont été bien moins nettes que celles que j'ai obtenues après 48-50 heures, sur lesquelles je veux bien m'entretenir. J'ai voulu suivre toutes les phases de chaque réaction, en examinant les résultats une demie heure, deux, six et vingt-quatre heures après l'opération.

La méthode au $CuSO_4$ donne déjà après une demie heure (un peu plus de ce que M. Leifson avait affirmé), une réaction suffisamment évidente, réaction qui est plus prononcée au bout de 2-3 heures et qui devient intense après 6 heures. Au bout de 24 heures elle persiste encore très nette, mais la lecture la meilleure est sans doute celle qu'on fait après 6 heures.

Le perchlorure de fer donne, lui-aussi, une réaction nette, qui se manifeste plus lentement que la première et qui persiste également au bout de 24 heures, très marquée.

L'addition de l'eau oxygénée, après addition de KOH et immersion dans l'eau bouillante, m'a donné des résultats tout à fait négatifs, avec des virages excessivement lents et bornés seulement à quelques uns des tubes assurément positifs.

La méthode classique, après 12 heures de séjour au thermostate à 37° des tubes additionnés de KOH, m'a donné des résultats satisfaisants. Certainement, quoique la vitesse de réaction se manifeste même déjà après 3-6 heures, elle est bien plus lente que celle qu'on observe lorsqu'on emploie la méthode au sulphate de cuivre, ou au perchlorure de fer.

A la suite de ces résultats j'ai voulu répéter intégralement les réactions dont je viens de parler, en me servant d'un milieu bien plus riche que celui de Clark et Lubs, c'est-à-dire le bouillon ordinaire, contenant l' 1% de glucose; j'ai évité d'ajouter à ce bouillon toute sorte d'extraits de viande qui auraient produit une forte coloration du *substratum*, et j'ai stérilisé moyennant la méthode discontinuée, afin d'empêcher un noircissement.

J'ai obtenu même ici une lecture plus nette et plus probative après 48-50 heures de thermostate et au bout de 4-6 heures après l'addition du réactif. Il n'y a qu'un fait qui est digne d'être remarqué: moyennant le bouillon, j'ai pu obtenir une réaction caractéristique pour deux termes qui, dans le milieu plus pauvre, ne m'avaient permis que d'entrevoir le virage.

***

Etant donné que pour la plupart des AA., la base de la réaction est un phénomène d'oxydation qui se produit sur l'acétil-méthyl-carbinol, dérivé du glucose par l'activité métabolique du seul genre *Aërobacter*, avec l'addition de soude ou de potasse caustique, j'ai voulu expérimenter

l'action de quelques oxydants énergiques tels l'eau de chlore, l'hypochlorite de sodium, et l'eau de brome, par rapport à l'intensité et à la vitesse de la réaction même.

Pour ces milieux aussi les expériences ont été pratiquées soit moyennant le bouillon + glucose, soit le milieu de Clark et Lubs; on les a répétées 12, 36, 48-50 heures après l'ensemencement, en obtenant les résultats les plus complets au bout de 48-50 heures.

Ainsi que dans la méthode classique, j'ai ajouté à chaque culture une égale quantité de KOH ou de NaOH au 10% et, ensuite, 3-5 gouttes de réactif. Autant pour l'eau de chlore, que pour l'hypochlorite de sodium et pour l'eau de brome j'ai obtenu, au bout de 3-6 heures, l'*optimum* de la réaction, qui se traduit par la formation, dans la partie supérieure du *substratum*, d'un bel anneau jaune-rosé. On peut bien faire une lecture ultérieure, mais elle est moins évidente, à cause d'une action décolorante successive, due au chlore et au brome. Dans les bouillon-cultures j'ai obtenu, même à l'aide de ces méthodes, la positivité pour les deux termes habituels, qui se sont montrés faiblement positifs dans le terrein de Clark et Lubs.

La vitesse de la réaction, nette et marquée, en comparaison de celle donnée par la méthode classique, rend donc très utile l'addition de ces substances oxydantes. La plus pratique d'entre-elles est certainement l'eau de brome, soit au point de vue de l'économie, soit pour la facilité de sa préparation qui est possible même dans nos Laboratoires dépourvus d'une installation complète pour les recherches chimiques, soit enfin pour une plus grande stabilité de la solution vis-à-vis de l'eau de chlore.

Je dois encore faire remarquer que les enduits bactériens qui, au cours de toutes mes recherches, m'ont donné les résultats les plus satisfaisants, sont ceux âgés de 24 heures.

Conclusions. — 1) Parmi les méthodes rappelées ici: la méthode classique, celle au sulphate de cuivre, au perchlorure de fer, à l'eau oxygénée, la méthode à préférer c'est la première, c'est-à-dire celle au sulphate de cuivre, pour la rapidité, la sensibilité et l'évidence de la réaction. Au surplus, cette méthode consente une manualité plus simple, car elle contient déjà l'hydrate alcalin, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de l'additionner séparément, ainsi qu'il faut faire par contre quand on se sert de la méthode au perchlorure de fer et à l'eau oxygénée.

2) On pourrait employer, avec le même résultat satisfaisant, l'eau de brome, soit pour la facilité de sa préparation — qui est aussi économique — soit pour la netteté et la vitesse des réactions, qui ne sont certainement pas inférieures à celles qu'on obtient avec le sulphate de cuivre.

3) Le bouillon de viande, préparé à l'aide des artifices de technique dont j'ai parlé, et glucosé, peut remplacer avantageusement le milieu de Clark et Lubs, sur lequel, parfois, à cause de la pauvreté du *substratum* et de l'exigeance de certaines souches, les réactions se réalisent d'une façon très peu évidente et, même, ne se produisent point de tout.

Institut d'Hygiène - Université Royale de Florence.

MUCCI D. – **Hémolysines et agglutinines dans l'abcès de fixation.** Note.

Dans un travail précédent (1) j'ai étudié les modifications éventuelles des opsonines et des bactériolysines du sang, du plasma et du sérum dans le chien consécutivement à l'abcès de fixation, et je suis parvenu à conclure que le sang *in toto*, le sérum, le plasma du chien normal ne renferment pas de bactériolysines pour le streptocoque, le staphylocoque, le b. *coli* et le b. pseudocharbonneux, et que l'abcès de fixation ne provoque pas l'apparition d'anticorps bactériolytiques, tandis qu'il détermine, par contre, une augmentation des opsonines.

Les recherches en question sont parties de celles de M. N. Nestorescu (2) qui avait étudié les variations du titre alexinique du sérum et les modifications éventuelles des hémolysines et des agglutinines normales dans le chien chez lequel il avait produit un abcès de fixation moyennant l'injection de 1-2 cmc. d'essence de térébenthine.

Quant aux hémolysines et aux agglutinines normales, Nestorescu avait constaté qu'elles augmentent par suite de l'abcès de fixation.

Maintenant je vais relater les résultats obtenus après une deuxième série de recherches qui ont eu pour but d'étudier l'influence de l'abcès de fixation sur la production d'hémolysines et d'agglutinines.

J'ai employé la technique suivante: Des lapins de poids presqu'égal, étaient immunisés moyennant l'injection par la voie intra-péritonéale pratiquée à des intervalles de six jours, en trois reprises, de doses croissantes jusqu'à 20 cmc. de globules rouges de boeuf, soigneusement lavés à la solution physiologique stérile. Dix jours après la troisième injection on prélevait de chaque lapin, moyennant la piqûre du coeur, une petite quantité de sang et l'on procédait au titrage des hémolysines.

Le titrage hémolytique du sérum de chaque animal établi, on faisait

---

(1) D. Mucci: *Influenza dell'ascesso di fissazione sulle opsonine e sulle batteriolisine normali del sangue, del plasma e del siero* (Bollett. Istit. Sieroterap. Milan., fasc. VIII, 1931).

(2) N. Nestorescu: Soc. Romaine de Biologie 6 et 19 Juin 1929; C. R. S. B., Tome II, 1929, pag. 120-122.

la répartition des animaux en deux groupes. Chez les lapins appartenant au premier groupe on provoquait un abcès de fixation; l'autre groupe servait comme témoin.

Chaque semaine, après la formation de l'abcès, on prélevait « *more solito* » une petite quantité de sang pour le titrage des hémolysines dans le sérum de chaque animal ,afin de voir quelles modifications du titrage hémolytique s'étaient éventuellement produites chez les animaux porteurs de l'abcès de fixations, en comparaison des lapins témoins.

Pour obtenir les agglutinines j'ai injecté des lapins, par la voie intraveineuse, avec des suspensions de 1-3-5 anses de culture en agar de bacilles du typhus. Les injections étaient espaciées de 7 jours. Dix jours après la troisième injection je titrais le pouvoir agglutinant du sérum, puis je procédais à la répartition des animaux en deux groupes, comme j'ai dit plus haut: ensuite je produisais l'abcès dans les animaux d'un de ces groupes; et enfin je titrais périodiquement le sérum des animaux de tous les deux groupes.

Je résume en ces deux tableaux les résultats de mes recherches:

Pouvoir hémolytique.

N° d'ordre	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3
Titrage hémolytique du sérum avant l'abcès.	1 : 2500	1 : 1800	1 : 2000
Titrage hémolytique du sérum une semaine après l'abcès	1 : 2500	1 : 2000	1 : 2000
Titrage hémolytique du sérum deux semaines après l'abcès	1 : 2500	1 : 2000	1 : 2000

Contrôles: Les lapins contrôles ont donné des résultats identiques.

Pouvoir agglutinant.

N° d'ordre	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3
Titrage agglutinant du sérum avant l'abcès.	1 : 1000	1 : 1250	1 : 1500
Titrage agglutinant du sérum une semaine après l'abcès	1 : 1000	1 : 1500	1 : 1500
Titrage agglutinant du sérum deux semaines après l'abcès	1 : 1000	1 : 1250	1 : 1500

Contrôles: Les lapins contrôles ont donné des résultats identiques.

Conclusions. — L'abcès de fixation ne produit chez les animaux en voie d'immunisation aucune modification sur la production des hémolysines et des agglutinines.

En comparant les résultats obtenus au cours de mes recherches avec ceux de M. Nestorescu, on doit déduire que l'abcès de fixation, tout en

déterminant une augmentation des hémolysines et des agglutinines normales, n'a point d'action sur celles qui se produisent pendant l'immunisation active.

Institut de Pathologie Spéc.-Chirurgicale de l'Université Royale de Siene.

JONA A. – Le mécanisme d'action de la protéinothérapie.

Le mécanisme d'action de la protéinothérapie qui, après l'observation faite sur l'efficacité curative des sérums non spécifiques vis-à-vis de certaines affections d'une nature microbienne avérée (sérum antidiphtérique dans le traitement de la pneumonie, de l'érysipèle, etc.), a été successivement pratiquée moyennant les protéines les plus variées, à partir des protéines bactériques (émulsions de b. coli, de paratyphus, de vibrion cholérique, etc.) jusqu'à celles du lait (caséine, lactoalbumine, lactoglobuline), aux stomosines de Centanni et à la peptone de la viande, etc., est resté toujours obscur. Les interprétations du phénomène qui apporte généralement du bénéfice dans les formes infectieuses (et même en d'autres de nature peu connue), ont été nombreuses, mais jusqu'à présent on n'a pu démontrer rien de déterminé.

On connait les réactions immédiates et consécutives qui suivent l'introduction de protéines hétérogènes par la voie intra-veineuse, ou même seulement par la voie parentérale, c'est-à-dire ce qu'on appelle « crise hémoclasique ». Elle se traduit par les troubles suivants: frissons, nausées et vomissements, tachycardie, urticaire, hypothermie, hypotension artérielle, leucopénie, malaise général, douleurs aux articulations, rachialgie très prononcée; tous ces symptômes présentent une gravité différente, suivant la dose de la substance injectée et la modalité de l'injection: c'est-à-dire, si la substance a été inoculée directement dans la circulation ou dans les muscles. Ces phénomènes qui, parfois, peuvent manquer en partie, sont suivis, à une courte distance, par une réaction de l'organisme dans un sens opposé, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation de la température, de la pression artérielle, du nombre des leucocytes avec une prédominance des polynucléaires jeunes et des gros mononucléaires, de l'élimination de l'azote uréique, etc.

Mais il n'est pas facile à établir lequel des éléments immunitaires joue ici le rôle prédominant.

Or, après avoir étudié, par de précédents travaux, l'équilibre des défenses immunitaires pour l'infection d'un germe virulent donné, chez un animal à expérience (lapin) normal et pathologique (néphrite par sublimé), j'ai voulu réaliser, dans le but d'apporter une contribution aux

intéressantes recherches dont il est discours, une série d'expériences sur l'étude de l'équilibre des réactions immunitaires d'un animal sain (lapin) traité aussi bien avec un germe virulent (staphylocoque), qu'avec la lacto-protéino-thérapie.

Je vais relater ici, en résumé, le plan de mes expériences et les résultats obtenus.

De même qu'au cours de mes travaux précédents, j'ai pris en considération le pouvoir bactéricide du sang et d'un certain nombre d'organes (peau, foie, rate, muscle, rein), le pouvoir phagocytaire du sang, les variations du pouvoir antihémolytique du sérum sur une solution de saponine au 0,003% en contact avec une suspension de globules rouges au 2% (considérées comme le quotient cholestérinique du sérum); j'ai étudié, en plus, la répartition des germes dans le sang et dans les organes susdits, la température, le nombre des leucocytes, la formule leucocytaire ayant un regard particulier au schéma d'Arneth et à l'hémogramme de Schilling. Enfin j'ai pratiqué quelques sections histologiques des organes susmentionnés, pour l'étude des réaction du S. R. E.

Au cours de quelques essais préliminaires, en considérant, pour m'orienter, seulement la température, les variations de la leucocytose et de la formule leucocytaire, le pouvoir bactéricide et phagocytaire du sang et en faisant quelques observations histologiques, j'ai pu établir soit le degré moyen de réaction de l'animal, moyennant différentes doses de lait écrémé introduit dans le sang, soit le temps des différentes réactions. Ensuite j'ai fait des expériences en utilisant différentes quantités de lait (1/10; 1/4 de cmc. et 2 cmc.), injectées dans le coeur de l'animal, en des temps divers: avant, après et simultanément à une quantité déterminée de suspension bactérique (choisie de façon à obtenir, par des dilutions successives, celle qui aurait donné, dans la plaque pour le nombrement des germes dans le sang, un nombre de colonies facile à calculer).

De même, au cours de ces expériences, on a sacrifié les animaux à des heures différentes (de trois heures jusqu'à 48 h. et plus encore).

Naturellement, chaque expérience a été pratiquée moyennant trois animaux, c'est-à-dire: un animal témoin sain, non injecté; un deuxième, injecté à l'aide de la seule suspension bactérienne; le troisième, traité moyennant les germes et le lait.

J'ai réalisé, de la sorte, une soixantaine d'expériences dont je vais relater les résultats, en négligeant les détails des différentes recherches.

L'injection de lait qui est nécessaire pour déterminer une remarquable réaction biologique chez un lapin d'environ 2 Kg. et demi, doit être de 1/4 de cmc. au moins; 2 centimètres cubes de lait administrés par la voie intraveineuse ou par injection intra-cardiaque provoquent une réaction bien plus prononcée et il sont de même bien supportés. Aussi 5 cmc. de

lait, introduits directement dans la circulation, n'ont pas un résultat fatal pour l'animal.

L'introduction du lait est immédiatement suivie par un choc hémoclasique, dont l'intensité est en rapport au facteur individualité organique de l'animal, et à la quantité de lait introduite.

Les réactions immunitaires de l'animal apparaissent, d'habitude, à la troisième heure et elles sont plus marquées et plus rapides à se montrer, lors de l'examen histologique du S. R. E.; c'est seulement plus tard que l'on constate une augmentation du pouvoir bactéricide du sang et du pouvoir phagocytaire et anti-hémolytique du sérum, augmentation qui se manifeste pendant que la leucocytose et l'hyperthermie reparaissent, successivement aux faits de dépression du premier moment, et précisément vers la sixième heure. Les germes disparaissent bientôt du sang et il n'est presque pas possible de les retrouver dans les cultures en agar des extraits aqueux des organes.

La réaction immunitaire est plus vigoureuse lorsque l'injection de lait est pratiquée dans le moment où il y a la reprise de la température, etc., successivement au choc que l'introduction de la suspension bactérienne provoque de par elle-même, quoique en un degré plus modéré.

Analogiquement, cette réaction est plus prononcée lorsque l'injection des germes est faite pendant la période successive au syndrome de dépression provoqué par l'injection de lait. Autant l'une que l'autre, pratiquées pendant la période de choc de l'animal, vont empirer le choc même, en rendant moins vigoureuse la réaction biologique immunitaire. Si les injections sont faites en même temps, elles déclanchent parfois les phénomènes de dépression les plus marqués et, en général, à réaction plus tardive et moins prononcée.

En particulier, l'injection de lait exalte le pouvoir bactéricide et celui phagocytaire du sang, le pouvoir anti-hémolytique du sérum sur la solution de saponine (quotient cholestérinique), et le S. R. E. du foie et de la rate. La période de la réaction immunitaire dure très longtemps (de 10 jusqu'à 48 heures).

Institut de Bactériologie et Immunologie de la Royale Université de Turin, Hôpital « Maria Vittoria ».

JONA A. – Recherches sur l'électivité des tissus du staphylocoque.

La localisation élective d'un germe pour un tissu déterminé c'est une question assez discutée, et qui a intéressé même récemment les rechercheurs. D'après les résultats des expériences de Rosenow et d'autres savants (Billing, Kruse, Panzini, etc.) on devrait admettre la possibilité d'imprimer à un germe, moyennant des artifices techniques particuliers, une localisation bien déterminée.

Pesch, Loffler et Weber auraient obtenu avec le même streptocoque isolé d'un malade déterminé des variétés aptes à reproduire, chez les animaux, des maladies identiques à celles que le streptocoque en question avait provoquées chez l'homme.

Cette propriété de se localiser d'une façon élective persisterait longtemps si l'on emploie, comme milieu cultural, les tissus mêmes pour lesquels le germe a acquis une électivité. C'est ainsi que Rosenow et d'autres Auteurs ont pu obtenir des ulcères gastriques, des colites ulcéreuses, etc., même à distance de l'inoculation du germe.

Par contre, les résultats obtenus par d'autres expérimentateurs (Schottmuller, etc., Lehmann, Roccia, Pecco et Trivellini, etc.) ont été bien différents, pour ne pas dire même négatifs. Les différentes localisations du streptocoque fûrent expliquées par les différents degrés de virulence du germe (Allaeis) et l'on révoqua en doute l'interprétation des résultats expérimentaux de Rosenow et de son École.

L'argument si intéressant m'a poussé à réaliser une série d'expériences moyennant une souche de staphylocoque virulent que j'ai voulu cultiver *in vivo* et *in vitro* à l'aide de repiquages pratiqués dans le lapin: d'un côté dans les reins de l'animal, et de l'autre côté dans le tissu de l'articulation du genou.

J'expose ici, en résumé, le procédé que j'ai suivi pour les deux tissus: je préparais des tubes stériles, moyennant des fragments de tissu articulaire ou de tissu rénal, de manière qu'ils pêchaient dans une petite quantité de bouillon stérile; j'ensemençais dans ces tubes le germe pathogène et j'en faisais le passage périodique (tous les 4-5 jours), en contrôlant la pureté culturale du germe même lors de chaque passage, sur plaques d'agar-tapioka. Pour le repiquage *in vivo* je mettais à nu, stérilement, la région intéressée (reins ou articulation) où j'inoculais quelques gouttes d'une suspension épaisse d'enduit microbien; au bout de 3-4 jours, en gardant toujours l'asepsie la plus diligente, je recherchais dans la région ou dans le point inoculé l'exsudat plus ou moins abondant et je procédais à une réinoculation en d'autre tissu (reins ou articulation) chez un autre animal, en préparant, en même temps, une plaque de contrôle.

Les plaques de contrôle, d'agar et tapioka, renfermaient toujours des fragments du tissu correspondant à un organe donné et l'ensemencement du germe était très soigneusement fait sur leur bords afin de maintenir — dans le cas où l'on aurait dû reprendre le germe par souillement de la culture — les propriétés éventuellement acquises pendant les transplantations précédentes.

J'ai donc pris en considération le pouvoir bactéricide du sang et des organes (rein, rate, foie, muscle, peau, dans les expériences moyennant les reins; rein, rate, foie et articulation dans les expériences moyennant l'articulation), aussi bien que le pouvoir phagocytaire du sang, les variations du pouvoir antihémolytique du sérum sur le système, solution de saponine au 0,0033%, suspension de globules rouges au 2% (quotient cholestérinique), la répartition des germes dans le sang et dans les tissus (v. s.) la température, le nombre des leucocytes, la formule d'Arneth, l'hémogramme de Schilling et l'étude du S. R. E. dans les organes susdits.

Chaque expérience, soit pour ce qui se rapporte au rein, soit pour l'articulation, a été faite en utilisant quatre animaux simultanément, et précisément: un animal témoin, un deuxième qui était injecté moyennant le germe originaire (A), un troisième qui était injecté avec le germe cultivé *in vitro* (B), et enfin un quatrième que l'on injectait moyennant le germe cultivé *in vivo* (C).

Au cours des expériences faites à l'aide de la transplantation de la souche de staphylocoque d'un rein à l'autre, j'ai constaté un fait remarquable, c'est-à-dire une augmentation du pouvoir bactéricide du tissu rénal autant pour le germe cultivé *in vitro* que, et plus encore, pour le germe cultivé *in vivo*. Cela fait penser soit à la provocation d'une réaction plus prononcée, déterminée dans ce tissu particulier par le germe, soit à une diminution de résistence du germe vis-à-vis de l'action des éléments du tissu à l'étude.

Quant au tissu articulaire, j'ai remarqué en deux des quatres expériences réalisées, un amas de germes supérieur à celui que j'avais observé dans les autres organes; or, si la présence de cet amas ne nous permet de conclure à une électivité de localisation du germe à l'étude pour l'articulation, elle nous fait penser pourtant à une certaine tendance du germe même vers cette électivité. Cela a plus de valeur si l'on tient compte du fait que, en comparaison des reins ou du foie, le tissu articulaire n'est pas localisé dans un ou dans deux organes, mais il est diffus à plusieurs parties de l'organismes.

Tous les deux groupes d'expériences ont mis en évidence une nette augmentation de la virulence du germe, pour ce qui en est à la souche cultivée *in vivo*.

Or, si d'après l'ensemble des expériences on ne peut pas considérer

comme prouvée la possibilité de la localisation d'un germe (staphylocoque) pour un tissu donné moyennant les repiquages successifs de ce germe dans ce même tissu, on ne peut pas même l'exclure; mais il y a plusieurs éléments qui engagent à insister dans les recherches, suivant le plan que nous venons de tracer, quoiqu'en variant l'espèce microbienne, le sujet d'expérience et ses conditions biologiques.

Institut de Bactériologie et Immunologie de l'Université Royale de Turin, Hôpital « Maria Vittoria ».

POZZI L. – **Recherches histologiques comparatives a propos des alterations déterminées par des bacilles tuberculeux vivants et morts.**

Je me suis proposée d'étudier les réactions histologiques dans le cobaye, soit vis-à-vis des masses bacillaires vivantes ou mortes et mélangées, soit vis-à-vis des bacilles partiellement dégraissés, dans le but de voir s'il était possible de constater quelque régularité de comportement qui nous consentait de distinguer les pures et simples influences chimiques et physiques des bacilles morts, d'autres influences éventuellement plus complexes dues à l'aggressivité des germes vivants. J'ai voulu donc acquérir, par là, une base anatomique plus solide par rapport aux discussions sur l'action des vaccins vivants ou morts.

J'ai utilisé une souche de tuberculose humaine qui se trouvait au Laboratoire depuis plusieurs années et qui est peu virulente, de sorte qu'il faut employer des doses élevées pour déterminer des infections sûres.

Mes expériences ont été pratiquées moyennan tdes bacilles émulsionnées dans la solution physiologique, et des émulsions chauffées pendant une heure à 75°, à de doses différentes, ainsi qu'en employant des bacilles partiellement dégraissés à l'aide d'une extraction à l'éther, prolongée.

Les réactions précoces dues aux bacilles morts ressemblent, en partie — mais en partie elles s'en différencient — aux réactions dues aux bacilles vivants injectés à de doses massives et en quantité égale, par la voie endopéritonéale, tandis que, dans les expériences pratiquées jusqu'ici, l'administration de bacilles vivants et morts faite simultanément n'a présenté rien de particulièrement remarquable vis-à-vis des bacilles vivants.

Les bacilles vivants aussi bien que les bacilles morts donnent lieu à une intense mobilisation des deux grands systèmes: histiocitaire et leucocytaire hématogène. Les bacilles morts, pourtant, développent une action plus considérable et plus rapide envers le système leucocytaire, jusqu'à amener une véritable infiltration à caractère purulent; par contre,

les bacilles vivants — abstraction faite de la question de l'afflux leucocytaire initial — tendent plutôt à exciter les éléments réticulum-endothéliaux (macrophage).

La tendance à la formation du véritable tubercule diminue suivant cet ordre: bacilles vivants, bacilles morts intègres, bacilles dégraissés. Il paraît que l'élimination d'une partie des lipides bacillaires réduit l'aptitude irritante et activante pour le système réticulum-endothélial, mais elle ne parvient à la supprimer du tout; on peut dire que sa démarche est peut être modifiée dans un sens moins spécifiques et qu'il se détermine, dans certains organes (omentum, rate), des réactions mononucléaires amenant des formations de type spécial (pseudo-cellules de Langhans).

Mais il paraît que les bacilles vivants plus que les bacilles morts apportent des modifications à la réactivité organique envers le bac. de Koch.

La nécrose caséeuse dans un véritable tubercule dû aux bacilles vivants, apparaît bientôt (au bout de huit jours), mais on l'entrevoit même dans les tubercules dus aux bacilles morts. J'ai constaté, dans les poumons, l'hyperplasie lymphoïde caractéristique, consécutive au traitement à l'aide soit de bacilles vivants, soit de bacilles morts.

J'ai constaté enfin que chez les animaux traités moyennant les bacilles dégraissés, la rate montrait un processus caractéristique de fibro-adénite périphérique du follicule.

Institut de Pathologie Générale de l'Université Royale de Milan.

Direttore responsabile: Dr. Prof. A. Zironi.

QUARTO CONGRESSO DELLA SEZIONE ITALIANA DELLA SOCIETA' INTERNAZ. DI MICROBIOLOGIA

PRESSO L'ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE

MILANO 3, 4 e 5 OTTOBRE 1932 - Anno X

PROGRAMMA:

LUNEDÌ 3 OTTOBRE.

Ore 9,30 - Apertura del Congresso e relazione annuale del Presidente Prof. S. BELFANTI.

Ore 10 - Inizio dei lavori: Relazione del Prof. GINO DE' ROSSI: *I microbi del terreno e la fissazione dell'azoto atmosferico.*

Comunicazioni:

1) PEYRONEL Prof. B.: *Assenza di micorrize nelle piante insettivore ed emiparassite, e probabile significato della micorrizia.*

2) CASTELLI Dott. T.: *Ricerche microbiologiche su parcelle di un medesimo terreno coltivato a grano e diversamente concimate.*

3) SCARAMELLA Prof. P.: *Una nuova specie isolata nel terreno nelle due sue forme: « Botritis » e « Coccospora Peyronel ».*

4) SCARAMELLA Prof. P.: *I funghi dei terreni di alta montagna.*

5) ARNAUDI Prof. C.: *Microbi fissatori d'azoto nel terreno di risaia.*

Discussioni:

Ore 14,30 - Relazione del Dott. DOMENICO VIOLA: *Gruppi sanguigni e costituzione fisica.*

Comunicazioni:

6) TENEFF Dott. S.: *Valori quantitativi delle proprietà gruppo specifiche e costituzione.*

7) LATTES Prof. L.: *Eccezionale contributo casistico alla diagnosi individuale delle tracce di saliva.*

8) Lattes Prof. L.: *Sulla preparazione degli antisieri gruppo specifici anti- ed anti-MN.*

9) Schiassi Prof. F.: *Gruppi sanguigni e costituzione.* (Studiate in 600 soggetti emiliani di età da 12 ai 18 anni).

Ore 17 - Conferenza del Prof. H. Sachs: *Un venticinquennio di sierodiagnosi della sifilide.*

Martedì 4 Ottobre.

Ore 9 - Relazione del Prof. Gianni Petragnani: *Le dissociazioni microbiche.*

Comunicazioni:

10) Cerruti Prof. C. F.: *Ricerca ed identificazione dei bacilli metadissenterici.*

11) Pugnani Dott. E.: *Tentativi di dissociazione di uno stipite di bacterium-coli.*

12) Soule Prof. Malcolm M.: *Contributo alle conoscenze delle dissociazioni microbiche.*

13) Trossarelli Dott. L.: *Osservazioni sperimentali sulla dissociazione del B. Piocianeo.*

14) Fiori Dott. C.: *Fenomeni di dissociazione della Nisseria gonorrhoeae.*

15) Nosotti N.: *Sulla variabilità del bacillo di Shiga coltivato in presenza dell'immunsiero.*

16) Petragnani Prof. G.: *La migrazione attraverso la candela porosa come incitante ai fenomeni dissociativi.*

17) Daddi Dott. Giuseppe: *Sulla variabilità del B. Prodigioso.*

18) Buonomini Dott. G.: *Ricerche delle varianti nelle culture del B. di Eberth-Gaffky.*

19) Vanni Dott. S.: *Ricerche delle varianti in brodoculture normali di B. Coli.*

20) Petragnani Prof. G. e Mazzetti Prof. G.: *Culture secondarie della cultura in brodo del B. di Koch e loro influenza sul B. di Koch stesso.*

21) Mazzetti Prof. G.: *Varianti nella capacità riproduttiva « in vitro » del B. di Koch.*

Discussioni:

Ore 14,30 - Relazione del Prof. G. B. Allaria: *Le encefaliti post-vacciniche.*

Comunicazioni:

22) Frontali Prof. G. e Radici Dott. M.: *Ricerche sul virus polioencefalitico e poliomielitico.*

Ore 17 - Conferenza del Prof. C. Neuberg: *Le condizioni chimiche ed energetiche nella scissione e trasformazione degli idrati di carbonio per opera di varie cellule e dei loro fermenti.*

Mercoledì 5 Ottobre.

Ore 9 - Relazione del Prof. G. Mariani: *L'immunità locale.*

Comunicazioni:

23) Morelli Prof. E.: *Rapporti sierologici fra i lipoidi di costituzione dei vari organi e di lipoidi neoplastici.*

24) De Santis Monaldi Dott. T.: *Azione di alcuni sali organici di calcio sul fenomeno di Koch.*

25) Cantani Prof. F.: *Contributo allo studio dell'immunità locale attraverso i principali risultati di un sessennio di ricerche sperimentali.*

26) Favilli Prof. G.: *Ricerche sul meccanismo dell'immunità locale.*

27) Bonanno Dott. M.: *L'immunità locale e mucosa intestinale.*

28) Toffoletto Dott. E.: *L'immunità istogena nella tubercolosi polmonare e una nuova forma di sieroterapia.*

Discussioni:

Ore 16,30 - Assemblea della Sezione e proposta dei temi per il prossimo congresso.

Ore 16 - Conferenza del Prof. G. Ramon: *Essai sur l'immunité antitoxique, la constitution et l'origine des antitoxines.*

Ore 17 - Inaugurazione ufficiale del nuovo reparto per la produzione dei sieri dell'Istituto Sieroterapico Milanese.

Ricevimento d'onore.

DE' ROSSI G. – **La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. – II.e Les Azotobacters dans les différents terreins d'Italie.**

Avant que M. Winogradsky eut élaboré sa précieuse méthode de la cultivation directe des azotobacters du sol, on pouvait obtenir leur détermination quantitative seulement à l'aide du procédé d'Hiltner et Störmer, c'est-à-dire moyennant l'ensemencement de liquides sélectifs avec des suspensions de terre à des diluitions graduellement croissentes. Naturellement les données obtenues de la sorte n'étaient ni très exactes, ni trop sûres. Et même la simple constatation de la présence des azotobacters dans le sol, constatation qui s'appuyait sur l'addition de considérables quantités de terre au liquide de Beijerinck au à d'autres semblables solutions sucrées, ne pouvait pas être dépourvue d'erreur, car en des conditions culturales pareilles les azotobacters n'arrivent pas toujours à prendre le dessus sur toutes les autres espèces microbiennes du sol et à se rendre visibles soit macroscopiquement, soit microscopiquement (Winogradsky). Cependant les nombreuses recherches purement qualitatives qui décelaient la présence des azotobacters dans tous ou presque tous les terrains normaux de la Russie (Omelianski et Salunskow), de l'Utah (Greaves), des Indes (Hutchinson), de l'Ombrie (de' Rossi e Faina), dans la moitié environ des terreins danois (Christensen), polonais (Ziemiecka), suisses (Burri), américains (Gainey), japonais (Yamagata), et dans la quatrième partie des terreins de bois américains (Gibbs et Batchelor), aussi bien que leur absence totale ou presque dans les sols généralement très acides de la Finnlande (Brenner), dans les terreins boisifs danois (Weiss et Bornebusch), dans les terreins des Alpes (Dûggeli), dans les vieilles cendres vulcaniques (Smith), etc., et de l'autre côté les évaluations quantitatives qui ont donné, par ex. 0-200 azotobacters pour un gramme de terre des forêts suisses (Dûggeli), 0-10,000 dans différents terreins de bois (1) (Feher), 1000-10.000 dans les terreins de la province de Salerne (Riccardo), 0–5.000 dans le terrein appartenant au champ expérimental de Cerignola (Rossi), 1800 *maximum* dans le sol français (Truffaut et Bezssonoff), nous consentent de conclure que

(1) Certains chiffres plus élevés (p. ex. celui de 1.010.000 qui, dans ces terreins d'une provenance et d'une nature très variées et présentant au cours de nombreuses recherches faites pendant une année un contenu en azoto-fixateurs tout à fait différent, apparaît tout d'un coup dans tous les terreins à la même époque pour disparaître aussi immédiatement dans tous) semblent n'avoir aucun valeur. Il faut encore remarquer que les recherches de Feher n'ont pas établi si et jusqu'à quel point la fixation de l'azote constatée dans les cultures par diluition était due à des chlostrides anaérobes plutot qu'à des azotobacters.

les azotobacters sont très répandus dans les terrains agraires de constitution physico-chimique normale, tout en gardant un quantitatif relativement modique.

Naturellement on ne doit pas prendre en considération les quantités récemment énoncées par Richter (155-188 millions d'azotobacters par gramme dans les terreins de Saratow), par Schulgina (15-54 millions dans le Tschernosem de Krasnodar), par Chodzew (4-5 millions dans le sol de Kazan), par Salensky et Kucharkowa (20-57 millions à Charkow). Ces chiffres sont basés seulement sur le simple examen microscopique du sol et sur la supposition que toutes les grosses formes microbiennes globeuses-ovulaires, en couples ou réunies en zooglées, auraient dû être considérées sans plus comme des azotobacters. Mais ainsi qu'on pouvait bien imaginer et ainsi qu'il résultait, au fond, des recherches culturelles pratiquées en même temps que les denombrements microscopiques, cette supposition était totalement fausse. Dianowa et Woroschilowa ont démontré qu'en isolant les formes interpretées par les AA. susmentionnés comme azotobacters, sur des substratums culturaux, on constate qu'elles appartiennent à des espèces tout à fait différentes, et qu'elles sont dépourvues de tout pouvoir azotofixateur.

Quant à l'emploi de la méthode de Winogradsky pour le dénombrement des azotobacters du sol, je suis à connaissance seulement des essais de M. Winogradsky même, qui dans les terreins actifs, c'est-à-dire dans ceux qui sont plus riches en azotofixateurs aérobies, a obtenu 2000-3000 colonies d'azotobacters pour gramme, et même 12.000 en des terreins soumis à des traitements particuliers, des recherches de Curie qui dans le sol des Etats Unis d'Amérique a dénombré de 0 à 750 azotobacters pour gramme, et enfin des résultats négatifs obtenus par Arnaudi et Jarach dans le sol de bruyère de la Lombardie.

En étant profondément convaincu de la valeur remarquable de la méthode de Winogradsky, et ayant en l'occasion d'y apporter quelques modifications, que d'aprés mon avis en rendent plus facile la réalisation et plus sûr et plus exact le résultat (1) j'ai voulu instituer, à l'aide de la méthode en question, une large revue des terreins italiens, au point de vue de leur contenu en azotobacters. Grâce à l'aimable collaboration de mes collègues, de quelques étudiants, et de plusieurs Directeurs de Chaires ambulantes d'agriculture (aux quels j'ai le plaisir de renouveler ici mes remerciements les plus vifs) j'ai pu réunir 189 échantillons de terre, prélevés à la profondeur moyenne de 10-20 cm., à partir du 1.er de mai, jusqu'au 10 de juillet 1932, c'est-à-dire dans la saison pendant laquelle, suivant l'opinion courante (Löhnis et Pillai, Krze-

(1) Cfr. ce même Bulletin N. VII-VIII, 1932.

mieniewski, Maassen et Behn, Kiessling, Gräf) le développement des azotobacters dans le sol atteint son maximum.

Généralement les échantillons renfermés en des récipients bien bouchés me parvenaient deux à six jours après le prélèvement et gardaient encore leur tas normal d'humidité. Sans procéder à aucun autre traitement, exception faite pour un diligent mélange que je faisais dans le but de leur conférér le plus d'omogénéité, j'en pésais 5 grammes sur lesquels je pratiquais le dénombrement cultural des azotobacters, suivant la technique que j'ai déjà exposée dans ma note susmentionnée. Il faut cependant remarquer que comme substratum je n'ai pas utilisé, l'agar seulement, mais j'ai toujours employé les plaques de silice aussi. La préparation parallèle des deux cultures nou seulement garantissait une plus grande sûreté dans les résultats, mais elle consentait aussi de contrôler largement l'utilité de la substitution proposée de la silice par l'agar simple comme support pour la solution nutritive des azotobacters. Les résultats n'auraient pas pu être plus favorables, puisque dans la plupart des cas les plaques de silice et d'agar m'out donné, au dénombrement, des chiffres parfaitement concordants; s'il y a eu quelques différences dans certains cas elles ont été toujors à la faveur de l'agar. Même en faisant des épreuves comparatives moyennant l'ensemencement des grains de terre, suivant Winogradsky, et en étalant des suspensions de terre à 1/80 et 1/800, d'après ma proposition, j'ai pu constater que cette deuxième méthode était nettement supérieure à l'autre.

Il ne m'a pas été possible de pratiquer une recherche systématique par rapport aux espèces d'azotobacters qui ont poussé sur les plaques; mais en les observant tout simplement j'ai eu l'impression, absolument certaine, que presque tous les terreins renfermant des azotobacters donnaient lieu à la formation de colonies séches et de colonies fluides en différentes proportions et que celles qui ont été appelées par M. Winogradsky colonies bombées n'apparaissaient que dans quelques cas. Le peu de temps dont je disposais m'a empêché aussi toute investigation se rapportant à la réaction et à d'autres caractéres chimiques des terreins; d'ailleurs de pareilles recherches auraient dépassé les bornes de cette note: en effet elle n'a pas pour but l'étude des rapports déjà bien établis existants entre la constitution physico-chimique du terrein et son contenu en azotobacters, mais elle doit simplement donner une idée de la diffusion de ces microrganismes dans les terreins de l'Italie.

Je vais immédiatement relater sur les résultats de mes analyses. Pour chaque échantillon de terre j'indiquerai la province et le territoire ou la localité de provenance, les caractéres qu'on a pu constater d'après une investigation sommaire, le nombre des azotobacters rapporté à un gramme de terre desséchée à l'air.

1.	*Bolzano*	(Soprabolzano) – Terre argilleuse-sablonneuse	0
2.	id.	(Santa Cristina) – Argilleuse-sablonneuse	0
3.	id.	(Bressanone) – Argilleuse, peu de sable, très épaisse	980
4.	*Trento*	(Ala I) – Sablonneuse-argilleuse à 1000 m. de l'Adige	8000
5.	id.	(Ala II) – Sablonneuse le long de l'Adige	3600
6.	id.	(Ala III) – Légèrement argilleuse, riche en oxyde de fer, auprès de la montagne	2800
7.	id.	(Ala IV) – Sablonneuse-argilleuse, à 500 m. de l'Adige.	7200
8.	*Trieste*	(Tomadio I) – Terre rouge, très argilleuse; vigne	330
9.	id.	(Tomadio II) – Terre rouge, très argilleuse; fruitier	960
10.	id.	(Tomadio III) – Terre rouge, très argilleuse; à blé	1600
11.	id.	(Roiano) – Très argilleuse avec de petits cailloux	1550
12.	*Fiume*	(Fiume I) – Terre rouge du Carse; Rivière du Carnaro	0
13.	id.	(Fiume II) – Terre rouge du fond du vallon; Rivière du Carnaro	2800
14.	*Gorizia*	(Vipacco) – Fortement argilleuse	3420
15.	id.	(Cernizza) – Très argilleuse; fortement agglomérée	4200
16.	id.	(Fusine) – Notamment argilleuse	1000
17.	id.	(Canale d'Isonzo) – Argilleuse-sablonneuse	3400
18.	id.	(Tolmino) – Argilleuse	2200
19.	id.	(Caporetto) – Très dissoute, légèrement argilleuse	2800
20.	id.	(Mariano) – Terre rouge, riche en petits cailloux calcaires.	1700
21.	id.	(Cormons) – Argilleuse, très agglomérée	1300
22.	id.	(Circhina) – Argill.-sablonneuse, riche en squelette grossier.	3100
23.	id.	(Val Zale) – Argilleuse, avec une petite quantité de sable.	0
24.	id.	(Montenero) – Argilleuse, assez agglomérée	900
25.	*Udine*	(S. Daniele) – Sablonneuse-argilleuse, plutôt dissoute	3080
26.	id.	(S. Maria la Longa) – Sablonneuse-argilleuse, assez agglomérée	1000
27.	id.	(Latisana) – Eminemment sablonneuse, avec peu d'argille.	320
28.	id.	(Spilimbergo) – Sablonneuse-argilleuse	2800
29.	id.	(Forni Avoltri) – Sablonneuse-argilleuse, riche en squelette grossier	5700
30.	id.	(Cividale) – Sablonneuse-argilleuse	3500
31.	id.	(S. Vito al Tagliamento) – Sablonneuse-argilleuse	5700
32.	id.	(Pordenone) – Sablonneuse-argilleuse	3300
33.	id.	(Tarvisio) – Sablonneuse-argilleuse	4560
34.	id.	(Tarcento) – Argilleuse-sablonneuse	5100
35.	*Padova*	(Conselve) – Sablonneuse avec peu d'argille	2500
36.	id.	(Granze) – Notamment sablonneuse	1200
37.	id.	(Padova) – Argilleuse	0
38.	id.	(Carrara S. Giorgio) – Argilleuse mais suffisamment dissoute.	800
39.	*Treviso*	(Breda di Piave) – Argilleuse-sablonneuse	680
40.	id.	(Spercenigo) – Compacte, très argilleuse	4560
41.	id.	(Villerba) – Sablonneuse-argilleuse	400
42.	id.	(S. Biagio di Callalta) – Compacte, argilleuse	2850
43.	*Vicenza*	(Coste di Arzignano) – Argilleuse, très agglomérée	7900
44.	id.	(Valle del Brenta) – Sablonneuse-argilleuse, plutôt dissoute.	600
45.	id.	(Collina Orientale) – Plutôt dissoute, pauvre en argille	2200
46.	id.	(Isola Vicentina) – Très dissoute riche en sable	1480
47.	*Sondrio*	(Sondrio) – Sablonneuse-argilleuse	600
48.	id.	(Grosco) – Sablonneuse-argill. avec plusieurs petits cailloux.	1700
49.	id.	(Val di Sotto) – Dissoute, sablonneuse-argilleuse	0
50.	id.	(Brianzone) – Notamment sablonneuse	0
51.	*Bergamo*	(Campo Rubasasso) – Terre rouge	3100
52.	id.	(Campo Morla) – Argilleuse avec peu de sable	690
53.	id.	(Campo Calcinera) – Sablonn. avec plusieurs petits cailloux.	380
54.	id.	(Campo Marca) – Argilleuse-sablonneuse	440
55.	id.	(Campo Bruciata) – Argilleuse avec peu de sable	1650
56.	*Brescia*	(Bornata) – Terre rouge	3200
57.	id.	(Bornata) – Argilleuse-sablonneuse	4000
58.	id.	(Bornata) – Argilleuse, fortement agglomérée	9600
59.	id.	(Bornata) – Argilleuse, fortement agglomérée	21400

60.	*Milano*	(Lodi; S. Rocco al Porto) – Sablonneuse avec peu d'argille.	1520
61.	id.	(Lodi; S. Martino Strada) – Plutôt argilleuse agglomérée.	1400
62.	id.	(Lodi; Crespiatico) – Sablonneuse-argilleuse	13600
63.	id.	(Lodi; Terranuova Passeroni) – Argilleuse-sablonneuse...	0
64.	id.	(Lodi; S. Martino Strada) – Très dissoute, riche en sable.	890
65.	*Cremona*	(Gadesco) – Sablonneuse avec peu d'argille	7200
66.	id.	(Persico) – Sablonneuse-argilleuse, très agglomérée	1000
67.	id.	(Corte dei Cortesi) – Sablonneuse, dissoute	6600
68.	id.	(Castelverde) – Sablonneuse, dissoute	300
69.	*Cuneo*	(Cuneo) – Très dissoute, sablonneuse, avec peu d'argille.	480
70.	id.	(Cuneo) – Très dissoute, sablonneuse, avec peu d'argille.	2240
71.	id.	(Fossano) – Sablonneuse-argilleuse	330
72.	*Imperia*	(Vallecrena) – Dissoute, très sablonneuse	8200
73.	id.	(Caramagna) – Fortement argilleuse, épaisse	7200
74.	id.	(Diano Marina) – Argilleuse-sablonneuse	0
75.	id.	(Diano Castello) – Argilleuse-sablonneuse	1850
76.	*Ferrara*	(Portomaggiore) – Sablonneuse-argilleuse	1600
77.	id.	(Copparo) – Argilleuse, très agglomérée	600
78.	*Forlì*	(Villanova) – Argilleuse avec très peu de sable	3200
79.	id.	(Ronco) – Argilleuse, avec peu de sable	1150
80.	id.	(S. Martino in Strada) – Argilleuse	0
81.	id.	(Pieve Acquedotto) – Eminemment argilleuse	0
82.	*Modena*	(Montagna) – Argilleuse, avec peu de sable	1900
83.	id.	(Collina) – Argilleuse, avec peu de sable	900
84.	id.	(Medio piano) – Très argilleuse	2850
85.	id.	(Piano basso) – Argilleuse	1660
86.	*Piacenza*	(Podenzano; Gariga) – Sablonneuse, avec peu d'argille...	0
87.	id.	(Podenzano; Faggiola vecchia) – Sablonneuse-argilleuse...	1700
88.	id.	(Borgonovo) – Assez argilleuse, à structure granuleuse....	920
89.	id.	(Gragnanino) – Sablonneuse-argilleuse, à structure granul.	250
90.	id.	(Casalegno) – Sablonneuse-argilleuse	250
91.	*Arezzo*	(S. Giov. Valdarno; Canonica) – Argilleuse	800
92.	id.	(S. Giov. Valdarno; Ceralfolle) – Eminemment argilleuse.	0
93.	id.	(S. Giov. Valdarno; Noce) – Eminemment argilleuse	400
94.	id.	(Cavriglia) – Sablonneuse avec peu d'argille	0
95.	id.	(Castiglion Fibocchi) – Argilleuse, avec une certaine quantité de sable	440
96.	id.	(Castiglion Fibocchi) – Argilleuse, fortement agglomérée...	900
97.	*Lucca*	(Farneta) – Terre rouge	0
98.	id.	(Cappella) – Sablonneuse-argilleuse, dissoute	1250
99.	id.	(Carraia) – Argilleuse avec une certaine quantité de sable .	2150
100.	id.	(S. Salvatore) – Sablonneuse-argilleuse	720
101.	*Massa Carrara*	(Pontremoli) – Très épaisse, argilleuse	570
102.	id.	(Fivizzano) – Argilleuse-sablonneuse	4560
103.	id.	(Fivizzano) – Argilleuse, agglomérée	570
104.	id.	(Fivizzano) – Argilleuse, agglomérée	2850
105.	id.	(Villafranca) – Sablonneuse, très dissoute	0
106.	id.	(Filattiera) – Sablonneuse-argilleuse, dissoute	0
107.	id.	(Montignoso) – Sablonneuse-argilleuse	3900
108.	id.	(Casamicciola) – Sablonneuse-argilleuse	6840
109.	id.	(Monteverde) – Sablonneuse-argilleuse	0
110.	id.	(Oliveti) – Sablonneuse-argilleuse	7980
111.	*Pisa*	(S. Miniato) – Eminemment argilleuse	0
112.	id.	(S. Miniato) – Sablonneuse, dissoute	440
113.	id.	(S. Frediano a Settimo) – Sablonneuse, dissoute	1150
114.	id.	(Volterra) – Squelette de cailloux très abondant; peu de terre dissoute	0
115.	id.	(S. Piero) – Sablonneuse-argilleuse	1340
116.	id.	(Navacchio) – Sablonneuse-argilleuse	880
117.	*Ascoli Piceno*	(Offida; Pietre) – Argilleuse sablonneuse	4080
118.	id.	(Offida; S. Lazzaro) – Argilleuse-sablonneuse	1200
119.	id.	(Offida; Cappuccini) – Argilleuse-sablonneuse	280
120.	*Macerata*	(Camerino; I Ponti) – Eminemment argilleuse	4000

121.	*Macerata*	(Camerino; Pianello) – Eminemment argilleuse	2400
122.	*Pesaro*	(Pesaro) – Dissoute, plutôt sablonneuse; à blé	800
123.	id.	(Pesaro) – Dissoute, plutôt sablonneuse; à luzerne	200
124.	*Perugia*	(Champ expérim. de l'Inst. R. Agricole) – Sablonneuse-argill	2240
125.	id.	(Tuoro; pays) – Sablonneuse-argilleuse	800
126.	id.	(Tuoro; gare) – Argilleuse compacte	1200
127.	id.	(Gubbio; S. Secondo) – Argilleuse	6460
128.	id.	(Gubbio; Villamagna) – Argilleuse	1120
129.	id.	(Gubbio; Palazzo) – Argilleuse avec peu de sable	320
130.	id.	(Montegabbione; Focaio) – Très dissoute ,sablonneuse	650
131.	id.	(Montegabbione; Tufo rosso) – Sablonneuse	0
132.	id.	(Piano Collelungo) – Fortement argilleuse	1200
133.	id.	(Collina Collelungo) – Fortement argilleuse	0
134.	id.	(Paciano) – Fortement argilleuse	0
135.	id.	(S. Biagio della Valle) – Fortement argilleuse	4000
136.	id.	(S. Biagio della Valle) – Argilleuse; agglomérée	3200
137.	id.	(S. Biagio della Valle; bois) – Fortement argilleuse	0
138.	id.	(S. Biagio della Valle; bois) – Argilleuse, agglomérée	800
139.	id.	(S. Biagio della Valle; bois) – Argilleuse-sablonneuse	0
140.	*Roma*	(Tuscania) – Argilleuse, très humeuse, agglomérée	220
141.	id.	(Tarquinia) – Argilleuse-sablonneuse, agglomérée	0
142.	id.	(Sezze Stazione) – Sablonneuse	0
143.	id.	(Sezze Selvetta) – Sablonneuse, dissoute, très humeuse	0
144.	id.	(Sezze Villafranca) – Sablonneuse, dissoute, très humeuse.	0
145.	id.	(Sezze Forno) – Eminemment argilleuse	1600
146.	id.	(Cisterna) – Sable	0
147.	*Chieti*	(Città S. Angelo) – Sablonneuse-argilleuse, agglomérée	330
148.	id.	(Cesaritti) – Sablonneuse-argilleuse	1150
149.	id.	(Penne) – Très argilleuse	3400
150.	*Campobasso*	(Campobasso) – Très dissoute, sablonneuse	0
151.	id.	(Termoli) – Argilleuse, très agglomérée	900
152.	id.	(Agnone) – Très dissoute, riche en sable	0
153.	id.	(Isernia) – Légèrement argilleuse, agglomérée	1700
154.	id.	(Larino) – Très dissoute, sablonneuse	0
155.	*Napoli*	(Secondigliano) – Notamment sablonneuse	0
156.	id.	(S. Maria la Fossa) – Argilleuse, épaisse, agglomérée	1100
157.	id.	(Caserta) – Sablonneuse avec peu d'argille	1000
158.	*Salerno*	(Eboli) – Argilleuse, très agglomérée	1100
159.	id.	(Roccadaspide) – Argilleuse, très agglomérée	800
160.	id.	(Scafati) – Très dissoute, sablonneuse	6300
161.	id.	(Buccine) – Très argilleuse	2200
162.	id.	(Cerase) – Sablonneuse-argilleuse, riche en oxyd e de fer	340
163.	*Bari*	(Barletta, Arenili) – Sablonneuse	0
164.	id.	(Barletta, Paludi) – Notamment argilleuse	500
165.	id.	(Barletta, Zona arborata) – Sablonneuse, dissoute	600
166.	id.	(Gravina) – Sablonneuse, argilleuse, plutôt agglomérée	250
167.	id.	(Altamura) – Notamment argilleuse, riche en humus	500
168.	id.	(Torre Macchia) – Très sablonneuse	700
169.	id.	(Putignano I) – Terre rouge, plutôt dissoute	900
170.	id.	(Putignano II) – Argilleuse, agglomérée	1150
171.	*Potenza*	(Montereale) – Sablonneuse-argilleuse, riche en squelette calcaire	680
172.	id.	(Chiaromonte) – Argilleuse avec peu de sable	1820
173.	*Catanzaro*	(Fondo Villa Gigli) – Très dissoute, sablonneuse	1100
174.	id.	(Fondo Carrozza) – Argilleuse, sablonneuse, agglomérée	2500
175.	id.	(Fondo Ali) – Notamment sablonneuse, très dissoute	0
176.	id.	(Fondo Barone) – Sablonneuse, argilleuse, riche en squelette grossier	300
177.	*Catania*	(Caltagirone) – Très dissoute, sablonneuse	0
178.	id.	(Villa) – Dissoute, sablonneuse	600
179.	id.	(Paternò, Pioppi) – Dissoute, sablonneuse	0
180.	id.	(Paternò, Navarro) – Sablonneuse avec peu d'argille	1600
181.	*Palermo*	(Corleone) – Argilleuse, agglomérée, riche en humus	0

182.	*Palermo*	(Partinico) – Plutôt dissoute, avec peu d'argille.....	0
183.	id.	(Rocca Palumba) – Argilleuse, très agglomérée	0
184.	id.	(Palermo) – Argilleuse-sablonneuse	0
185.	*Cagliari*	(Mandas) – Très argilleuse, agglomérée	320
186.	id.	(Villasor I) – Notamment argilleuse	1360
187.	id.	(Villasor II) – Sablonneuse avec peu d'argille	0
188.	id.	(Guasila) – Très argilleuse, agglomérée	900
189.	id.	(Senorbi) – Argilleuse-sablonneuse	1800

***

Le dénombrement des azotobacters a été pratiqué sur 189 échantillons de terre dont 90 provenaient de vingt provinces du Nord de l'Italie (Bolzano, Trento, Trieste, Fiume, Gorizia, Udine, Padova, Treviso, Vicenza, Sondrio, Bergamo, Brescia, Milano, Cremona, Cuneo, Imperia, Ferrara, Forlì, Modena, Piacenza), 64 venaient de onze provinces de l'Italie Centrale (Arezzo, Lucca, Massa Carrara, Pisa, Ascoli Piceno, Macerata, Pesaro, Perugia, Roma, Chieti, Campobasso), et 35 de huit provinces de l'Italie Méridionale et Insulaire (Napoli, Salerno, Bari, Potenza, Catanzaro, Catania, Palermo, Cagliari).

Voici dans le tableau suivant les résultats dûment resumés:

	Italie du Nord	Italie Centrale	Italie Mér. et Ins.	Italie en total
Nombre des azotobacters par gr. de terre desséchée:				
moyen	2.562	1.281	869	1.815
minimum	0	0	0	0
maximum	21.400	7.980	6.300	21.400
Nombre des échantillons contenants dans un gramme de terre desséchée:				
0 azotobacters	12 (*13,3%*)	21 (*32,8%*)	10 (*28,6%*)	43 (*22,8%*)
100-1000 »	23 (*25,6%*)	19 (*29,7%*)	14 (*40,0%*)	56 (*29,6%*)
1100-2000 »	18 (*20,0%*)	10 (*15,7%*)	8 (*22,9%*)	36 (*19,0%*)
2100-5000 »	24 (*26,7%*)	11 (*17,2%*)	2 (*5,7%*)	37 (*19,6%*)
5100-10000 »	11 (*12,2%*)	3 (*4,6%*)	1 (*2,8%*)	15 (*7,9%*)
13600-21400 »	2 (*2,2%*)	0	0	2 (*1,1%*)

Il ressort donc que:

1° Les 189 terrains d'Italie examinés renfermaient une moyenne de 1815 azotobacters par gramme de matériel desséché à l'air, avec un minimum de 0 (constaté en 43 échantillons, savoir dans le 22,8 pour cent) et avec un maximum de 13.600-21.400 (constaté en 2 échantillons, savoir dans l'1,1%).

2° L'évaluation du contenu moyen, minimum et maximum d'azotobacters, aussi bien que la répartition des échantillons examinés en six

groupes à contenu graduellement croissant en microbes, montrent nettement que les terreins du Nord de l'Italie sont particulièrement riches en azotobacters et que ces derniers sont bien moins nombreux dans les terres de l'Italie centrale, et encore moins dans celles de l'Italie méridionale et insulaire.

Laboratoire de Microbiologie Agraire et Technique de l'Inst. Roy. Sup. d'Agraire, de Pérouse.

BIBLIOGRAPHIE.

WINOGRADSKY: Annales de l'Institut Pasteur, 1925.
OMELIANSKI e SALUNSKOW: Arch. d. Sciences biolog., St. Petersburg, 1915.
GREAVES: Soil Science, 1918 (VI).
HUTCHINSON: Rpt. Agric. Res. Inst. and Coll. Pusa (India), 1911-12.
DE' ROSSI e FAINA, cité par DE' ROSSI: *Microbiol. agr. e tecnica*, pag. 1042.
CHRISTENSEN: Centr. für Bakteriol. II, 1907 (XVII).
ZIEMIECKA, cité par WAKSMAN: Soil Science, 1925 (XIX).
BURRI, cité par WINOGRADSKY: Annales de l'Inst. Pasteur, 1926.
GAINEY: Journ. of Agricult. Research, 1923 (XXIV).
YAMAGATA: Journ. of the Agricult. Chemic. Soc. of Japan, 1924.
GIBBS e BATCHELOR: Soil Science, 1927 (XXIV).
BRENNER: Agrogeol. Meddl. Geol. Komm. Finland, 1924 (N. 20).
WEISS e BORNEBUSCH: Boll. di Informaz. Agrarie ecc., 1915.
DÜGGELI: Centr. f. Bakteriol., II, 1926 (LXVIII).
SMITH: Journ. of Bacteriology, 1932 (XXIII).
DÜGGELI: Schweiz. Zeitschr. f. Forstw., 1923 (LXXIV).
FEHER: Archiv f. Mikrobiologie, 1930 (I).
RICCARDO: Annali d. R. Ist. Sup. Agrario di Portici, 1928 (III).
ROSSI: Annali di Igiene, 1932.
TRUFFAUT e BEZSSONOFF: Compt. rend. d. l'Ac. des Sciences, 1921.
RICHTER: Wissensch. Annalen d. Univers. von Saratow, 1925.
SCHULGINA: Bull. of the Inst. of Agricult. Mikrobiology, S.I.E.A., 1927.
CHODZEW: Ber. d. Inst. f. Land.- u. Forstw. in Kazan, 1928.
SALENSKY e KUCHARKOWA: Journ. of Wissensch. Landw., 1929.
DIANOWA e WOROSCHILOWA: Centr. f. Bakteriol. II, 1931 (LXXXIV).
WINOGRADSKY: Annales de l'Inst. Pasteur, 1926.
CURIE: Soil Science, 1931 (XXXII).
ARNAUDI e JARACH: Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiol., 1930.
LOEHNIS e PILLAI: Centr. f. Bakteriol. II, 1908 (XX).
KRZEMIENIEWSKI: Centr. f. Bakteriol. II, 1907 (XVIII).
MAASSEN e BEHN: Arb. d. Biol. Reichsanst. f. Land.- u. Forstw., 1924.
KIESSLING: Centr. f. Bakteriol. II, 1929 (LXXIX).
GRAEF: Centr. f. Bakteriol. II, 1930 (LXXXII).

PETRAGNANI G. – **Le phénol bactérien.** 2.ème Communication: **L'influence du pH sur la recomposition des corps bacillaires.**

Après ma communication faite à la Séance du 31 Juillet 1931 de la R. Acc. dei Fisiocritici in Siena, communication qui fut aussi publiée par ce Bulletin (Octobre 1931, pag. 647), mes recherches sur le phénol bactérien ont été répétées par G. Dessy (1): les résultats en furent positifs.

(1) DESSY: Boll. della Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microb. (avril 1932, pag. 99) et Boll. dell'Istituto Sieroterap. Mil., fasc. V, mai 1932, pag. 331.

J. Paraf et A. Abaza (1) ont au contraire obtenu, des résultats négatifs qu'ils ont relaté dans une communication très succinte: ces AA. ont toutefois mal préparé le *phénol bactérien* qu'ils disent avoir obtenu « En traitant dans un mortier une anse de Bacilles tuberculeux par de l'acide phénique cristallisé... ».

V. Puntoni (2) a obtenu des résultats incertains qui ensuite furent été interprétés par l'A. d'une façon complétement négative.

J'ai continué pendant ce temps mes expériences. Il me semble être le cas d'en publier de suire les résultats qui, selon mon opinion, peuvent donner une démonstration plus complète de l'hypothesè, dejà avancée, sur la recomposition des corps bacillaires dans des liquides où les protoplasmes se trouvaient dans un état particulier de dispersion: *sol.*

Préparation du « Phénol bactérien ». — Les voiles ou patines bactériennes sont introduites dans un mortier en verre où l'on ajoute, de temps en temps, du phénol pur cristallisé, dont la quantité totale surpasse de vingt fois le poids des corps bacillaires pésés humides. Il faut piler avec soin pendant plus d'une demie heure après avoir ajouté le phénol cristallisé.

On receuille le tout dans un flacon de verre jaune fermé par un bouchon à l'émeri.

Il y a des patinès bacillaires que l'on peut rendre plus facilements homogènes et d'autres moins. Par exemple les voiles qui se sont développés sur Sauton pendant plus de 4 semaines résistent plus longtemps à l'action homgénéisante du phénol. Comme jè l'ai fait observer dans ma 1.ère Communication, quel que soit le terrain d'où proviènnent les corps bacillaires, ils restent toujours dans le liquides des floccons semi-transparents, visibles à l'oeil nu et qui forment un sédiment sur le fons du flacon.

Il ne faut pas séparer du « *phénol bactérien* » à peine préparé, cette partie plus résistante, car àprès quelque temps elle tend à se dissoudre.

Le « *phénol bactérien* » qui peut servir, pour les expériences que j'ai décrites, quelques jours après avoir été soigneusement prèparé, ne devient que meilleur si on le laisse vieillir à la température du thermostate et si on l'agite énergiquement de temps en temps.

Le « *phénol bactérien* » intégral (qui contient les résidus floconneux) lorsqu'on le chauffe directement, dans une éprouvette à la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à l'ébullition, ou bien s'il est maintenu au bain-marie bouillant, ne dissout qu'une petite partie du dépôt floconneux. Bien qu'ainsi chauffé le « *phénol bactérien* » conserve ses propriétés.

---

(1) C. R. Soc. de Biol., 17 juin 1932, pag. 453.
(2) Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microb., juin 1932, pag. 161.

Les épreuves, dont j'exposerai brièvement les résultats, ont toutes été faites et répétées plusieurs fois avec un « *phénol bactérien* » préparé de la façon suivante: de 3 gros matras contenant du bouillon glyceriné au 4%, à pH 7,2, semés le 8 juillet 1931 avec une souche Landis de la collection, j'ai recueilli le 9 septembre 1931, après avoir coulé sur de la gaze pendant 12 heures, 23,5 grammes de patine bacillaire.

Cette quantité de voiles bacillaires frais fut introduite dans un gros mortier en verre et j'y ajoutais, lorsqu'on pilait, 150 gr. de phénol cristallisé et 5 cc. d'eau distilleé.

Après avoir pilé cette bouillie pendant une bonne demie-heure elle fut versée dans un flacon de verre jaune à bouchon d'émeri, et on y ajouta encore 450 gr. de phénol cristallisé et 20 cc. d'eau distillée.

On introduisit ensuite le tout dans un thermostate en agitant avec force de temps en temps.

Aujourd'hui encore on peut remarquer, dans ce flacon, un dépôt d'une substance floconneuse sémitransparente dont la masse est bien inférieure à celle des patines bacillaires pilées.

Pour ces expériences, dont les premières furent faites sur cet échantillon à la fin du mois de novembre dernier, on préleva, au moyen d'un siphon, la partie supérieure du liquide dans le flacon laissé en repos pendant quelques jours.

Centrifugation du « phénol bactérien ». — Le « *phénol bactérien* » préparé et prélevé de la façon décrite plus haut est parfaitement transparent, et possède les caractères du phénol liquide pur: sa couleur est légèrement jaune.

Centrifugé en deux reprises de 35 minutes à 3500-3700 tours, — contrôlés expressément — avec une centrifuge « Ecco - Superior - H » toute neuvem aucun sédiment ne s'en sépara. Les 2/3 supérieurs du liquide de chaque éprouvette centrifugée présentaient les mêmes caractères que le phénol sédimenté naturellement.

Le « *phénol bactérien* », filtré sur du papier, présenta les mêmes caractéres que celui laissé simplement sédimenter ou de celui centrifugé.

Puntoni, lorsqu'il affirme qu'après la centrifugation les formes bacillaires disparaissent du « *phénol bactérien* », démontre seulement qu'il l'a mal préparé.

Préparés microscopiques obtenus en se servant directement du « phénol bactérien ». — Une anse (1) de « *phénol bactérien* » répandue légérement sur une lame est ensuite séchée par l'air chauff d'une flamme Bunsen. Après avoir fixé le préparé par les passages ordinaires à la flamme

(1) Anse normale de 2 mm. de diamètre.

on le colore suivant la méthode Ziehl-Neelsen en chauffant légérement la fuchsine carbolique et en décolorant pendant une minute à peu prés avec de l'acide sulfurique au 10% et pendant 5÷10 secondes avec de l'alcool éthylique à 96°. La coloration du fond se fait avec du bleu de Löffler diené, à la température de l'ambiant. Les opérations sont alternées avec des lavages faits en trempant légérement (le préparé) dans des bassins d'eau. On le séche ensuite à l'air chaud d'un bec Bunsen.

L'examen microscopique se fait par le moyen d'un système de loupes apochromatiques.

Dans les préparés obtenus directement du « *phénol bactérien* » centrifugé et dans ceux du « *phénol bactérien* » filtré sur papier je ne parvins à découvrir que des groupes et des amas de granules acido-résistants, qui présentent souvent une forme allongée qui les fait ressembler à des petits tas de bacilles du tubercule: mais la réfractivité de ces granules est supérieure à celle des bacilles en question. On n'est que dans certains préparés que l'on trouve des éléments dont les caractéres sont ceux des bacilles acido-résistants. Leur nombre varie d'un préparé à l'autre: cela dépend probablement du fait qu'il n'est pas possible de contrôler exactement la vélocité de séchage et les temps de coloration.

Lorsqu'on ajoute à 1 cc. de « *phénol bactérien* » 3÷4 anses d'acide sulfurique dilué au 10% et si l'on en fait ensuite un préparé, on a l'impression que les amas de substance acido-résistante soient plus compacts et formés des granulations plutot rondes.

En ajoutant à 1 cc. du même « *phénol bactérien* » une anse d'hydrate d'ammonium concentré, on trouve dans les préparés des amas de granules généralement plus menus: il arrive parfois aussi d'observer des éléments ayant tous les caractères de véritables bacilles acido-résistants.

Ces caractères différentials des préparés obtenus directement du « *phénol bactérien* » à réaction normale, ou acidifié ou bien alcalinisé, ne sautent pas facilement aux yeux, mais ils ont été déduits de l'ensemble des observations faites sur un grand nombre de préparés.

Si on répand sur la même lame une anse de « *phénol bactérien* » *normal*, une autre de *phénol b. acide* et une de *phénol b. alcalin*, après avoir terminé la coloration on peut remarquer directement que le préparé du *phénol alcalin* est rouge, celui du *ph. normal* tend au violet et celui du *ph. acide* est bleu.

Pour empêcher que le matériel se détache des verres, ce qui arrive facilement lors des opérations pour la coloration, j'ai remarqué qu'il est utile de répandre sur les préparés déjà séchés, une petite anse de sérum frais de cobaye dilué au 50% avec de l'eau, à fin de mieux attacher le matériel à la lame lors de la fixation à la flamme.

Dans mon « *phénol bactérien* » on ne trouve donc que par hasard,

des formes ayant les véritables caractères morphologiques et tinctoriaux du b. tuberculeux, tandis que la grande majorité du résidu qu'elles laissent par évaporation directe est formée par des granules et des masses amorphes a. r. et des autres colorées en bleu. Si Puntoni, dans son « *phénol bactérien* » a trouvé une énorme quantité de bacilles de la tuberculose parfaitement conservés..... » il faut penser qu'il a fait ses recherches sans avoir séparé du « *phénol bactérien* » la partie floconneuse résistante, ou bien qu'il s'est servi d'un « *phénol bactérien* » mal préparé.

Solution du « phénol bactérien » dans l'eau. — Le « *phénol bactérien* » se dissout dans l'eau dans les mêmes proportions du phénol pur (5-6% au maximum). Il s'en différencie par ce que tout de suite le liquide devient trouble et parce qu'il s'en sépare des petits flocons (ça arrive mieux en agitant énergiquement l'éprouvette).

Dans le dépôt obtenu par centrifugation (3500 tours pendant 20 minutes) et immédiatement après avoir dissout on voit des amas colorés en bleu et d'autres en rouge, formés par de petits grains généralement à forme de bâtonnets et mal définis: dans le préparé se trouvent aussi épars des éléments bacillaires acido résistants parfaitement typiques.

En laissant cette solution aqueuse du « *phènol bactérien* » pendant quelques jours à la tempèrature de l'ambiant ou bien au thermostate, on observe que le nombre des formes bacillaires a. r. typiques est augmenté.

Les expériences faites avec de la solution physiologique donnèrent, au commencement, de mauvais résultats, car le matériel, riche en Na Cl, se détachait facilement. En lavant le dépôt avec de l'eau distillée on obtient de très bons résultats.

En introduisant dans une éprouvette à centrifuge 1 cc. de « *phénol bactérien* » traité avec une anse d'hydrate d'ammonium concentré, en y ajoutant 20÷30 cc. d'eau distillée et en agitant énergiquement et en passant enfin à la centrifuge, on observera que le dépôt est plus dissout que lorsqu'on fait l'expérience avec le « *phénol bactérien* » normal. Dans les préparés microscopiques, en outre, il y a un nombre inferieur d'amas granulaires et une plus grande quantité de bacilles acido résistants; cette acido résistance est très prononcée.

Les préparés faits qualques heures ou quelques jours après la dissolution du phénol alcalin dans l'eau, contiennent un nombre plus grand de formes bacillaires.

Dessy (cf. loc. cit.) affirme d'avoir remarqué, au cours de ses expériences, que les alcalis influent d'une façon négative sur la démonstration des bacilles a. r.

Pour m'expliquer d'une façon plus claire je ferai remarquer que

bien qu'il soit appelé *phénol* alcalin, le *phénol* que j'émploie est en réalité moins acide ou bien il présente une réaction neutre. Effectivement, aprés avoir dissout 1 cc. de *phénol bactérien* normal dans 30 cc. d'eau disti lée et avoir laissé cette solution en repos pendant 24 heures, j'en déterminai avec un potentiomètre, la valeur du pH qui résulta de 6,9-6,95: pour le phénol alcalinisé avec une anse d'hydrate d'ammonium j'ai observé que cette valeur n'était montée qu'à 7,1-7,15. Je ferai toutefois remarquer qu'un pH à 7,3 permet une meilleurs démonstration des bacilles a. r.

En ajoutant à 1 cc. de *phénol bactérien* 4÷5 anses d'acide sulphurique dilué au 10% et si l'on répéte les mêmes expériences, on remarquera tout d'abord, qu'après la centrifugation, le précipité ne s'est point déposé au fond mais qu'il se trouve adhérent, comme un voile, au parois de l'éprouvette: l'épaisseur de cette couche augmente vers le fond.

Dans les préparés obtenus en traitant le produit que l'on obtient en râclant soigneusement ce *voile* sur la parois de l'éprouvette, on n'observe que des amas bleus et d'autres qui sont acido résistants et présentent des granulations compactes: ce n'est que dans qualques préparés que l'on voit de rares formes bacillaires. En répétant l'examen microscopique sur ce même dépôt laissé en suspension dans el liquide; on remarque que les formes bacillaires deviennet de plus en plus rares à mesure que le liquide vieillit.

L'exclusion des formes bacillaires acido resistentes devient totale et immédiate en ajoutant au « *phénol bactérien* » une quantité d'acide plus forte. Dans le liquide de la suspension on ne trouve point de bacilles a. r.

Pour mieux connaître l'action reélle de cette addition d'acide, qui est toutefois très modeste si l'on pense que le b. de Koch se maintient inaltéré et reste vivant dans des solutions beaucoup plus concentrées, j'ai fait les experiences suivantes.

On laisse pendant une demie heure deux éprouvettes, contenant chacune 1 cc. de *phénol bactérien* et 4 anses d'acide sulfurique dilué à 1 : 10, à la température de l'ambient après avoir soigneusement agité pour répandre l'acide dans le *phénol*.

À l'une des éprouvettes j'ajoute ensuite 30 cc. d'eau distillée et à l'autre 6 anses d'hydrate de sodium au 10% (lorsqu'on ajoute l'alcali le phénol bacterien devient trouble). Après m'être assuré que le phénol est devenu uniformément alcalin j'ajoute aussi 30 cc. d'eau à cette éprouvette et agite énergiquement toutes les deux. Après les avoir laissées vette e je l'agite énergiquement avec la première. Après les avoir laissées pendant 3 heures à peu près à la température de l'ambient je les centrifuge à 3500 tours pendant 20 minutes.

Le dépôt de l'éprouvette contenant le *phénol bactérien* acide est

collé aux parois, tandis que dans celle contenant le *phénol* bac. acide alcalisé par la suite il y a un précipité déposé au fond.

Le liquide, dans l'éprouvette acide, présenta une valeur du pH égale à 4, *tandis que cette valeur, pour l'éprouvette alcalinisée, était* = 7,3. *Dans le dépôt de la première on ne trouva que des granulations et des masses amorphes, et dans celui de la seconde on remarqua la présence d'un grand nombre de bacilles très beaux et typiques, isolés et à petits tas, nettement acido-résistants.*

Cette expèrience démontre ainsi d'une façon évidente le mouvement des colloïdes dispersés dans le *phénol bac.* et nous montre que, parmi les conditions physique et chimique indispensables pour reporter à l'état *gel* normal les partigènes dispersés, il y a la réaction proche du point neutre: l'optimum des résultats est forni par une legère réaction alcaline (pH = 7,3). J'avais aussi observé ce fait au cours de mes expériences sur la recomposition — in vitro — des bacilles a. r. dans les filtrés des suspensions de ces bacilles, dans les quels je produisais la precipitation du phosphate de calcium (1).

Leur singulière labilité démontre que ces bacilles a. r. se sont vraiment reconstitués « in vitro ». En effet, en ajoutant au dépôt obtenu du *phénol bactérien*, dépôt qui contient un grand nombre de très belles formes bacillaires a. t., d'abord 10 cc. d'eau distillée et ensuite 2 gouttes d'acide sulfurique au 10%, en agitant et en centrifugeant de nouveau, on ne pourra observer que très rarement des formes bacillaires a. r.

Ces faits dont on ne peut douter et que tout le monde peut répéter, sont une démonstration en faveur de l'hypothèse de la reconstitution des corps bacillaires d'après des partigènes prèalablement dispersés à l'état de *sol.* Les expériences sur le *phénol bactérien* filtré ne sont nullement nécessaires, car au cours de ces épreuves les éléments bacillaires que l'on rencontre sont forcément en nombre très inférieur, car il est connu que les bougies poreuses ont le pouvoir de fixer plusieurs substances dispersées à l'état de *sol.* Si les bougies arrêtent même une petite quantité des antigènes partiaux du « *phénol bactérien* » ceux qui restent dans le filtré, même s'ils sont nombreux, ne donneront lieu qu'à peu de formes bacillaires.

En faisant l'expérience de la recomposition des formes bacillaires dans le filtré du « *phénol bactérien* » il faut surtout prendre soin de faciliter au plus haut degré le mouvement ordonné des partigènes qui ont réussi à traverser les bougies dans les équilibres et les proportions voulues pour la recomposition.

---

(1) Communication à la Reale Accad. dei Fisiocritici di Siena, séance du 29 janvier 1932 (voire les Atti) (Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microb., fasc. II, 1932.

Pour y parvenir le processus suivant me semble le plus adapté: à 1 cc. de « *phénol bactérien filtré par Chamberland L 2* » (il vaut mieux l'avoir filtré quelques jours auparavant) on ajoute 1 petite anse d'hydrate d'ammonium et 30 cc. d'eau distillée. On agite énergiquement le tout, on le laisse quelques jours en repos, on le centrifuge ensuite à 3500 tours pendant une demie heure et on fait les préparés en se servant du dépôt et du voile qui surnage le liquide.

Il faut recueillir avec soin la partie flocculée et la répandre sur la lame en la frottant longtemps avec la spatule de façon à obtenir une couche uniforme.

Il est bon de couvrir le matériel séché avec une anse de sérum de sang de cobaye, sécher ensuite nouvellement et fixer avec les passages ordinaires à la flamme.

La coloration au moyen de la fuchsine carbolique doit s'effectuer en chauffant modérément pendant 5 minutes. Il est bon que la décoloration avec l'acide sulfurique au 10% ne dépasse pas $1 \div 2$ minutes et celle avec l'alcool à 96° ne doit pas durer plus de $5 \div 10$ secondes. La coloration du fond se fait avec du bleu de Loeffler dilué.

Il ne faut pas sécher le préparé entre du papier: l'opération doit s'éffectuer à l'air chaude d'un bec Bunsen.

Institut d'Hygiène et de Bacteriologie de l'Université de Siena.

PETRAGNANI G. – **Le phénol bactérien. 3.ème Communication: Nouvelles recherches sur la recomposition des corps bacillaires dissous.**

Dans le but d'étendre et de contrôler les résultats obtenus au cours des expériences avec le « *phénol bactérien* » dissout dans l'eau, il m'a semblé être le cas de les répéter avec d'autres liquides capables de dissoudre l'acide phénique à une concentration plus forte pour que le phénomène s'établisse dans une masse beaucoup plus restreinte, ce qui rend aussi plus facile la lecture des resultats.

Les dissolvants employés furent: *l'éther sulphurique; l'alcool éthylique; l'alcool méthylique; l'acétone; le benzol; le xylol.*

En traitant un volume de *phénol bactérien* avec $1 \div 2$ volumes d'un quelconque des dissolvants ci-dessus, le liquide tout d'abord devient trouble et ensuite il se sépare un précipité floconneux, très abondant (éther, acétone) ou bien granuleux (alcool méthylique, benzol).

Ce précipité se sépare plus vite si on agite le liquide pendânt quelques instants.

Si l'on traite 1 volume du « *phénol bactérien* » avec 10 volumes de dissolvant, même en agitant pendant longtemps, la floculation retarde de plusieurs heures, et lorsqu'elle se manifeste (excepté pour l'acétone et pour l'éther) elle est formée par des grains très menus. Si on désire séparer la partie floculée au courant du jour même il faut centrifuger à 2-3000 tours. Avec un cc. du même « *phénol bactérien* » on obtient une plus forte quantité de précipité en le traitant avec une petite dose de dissolvant (1 : 2 volumes plutôt) qu'avec une dose plus forte (10 : 20 volumes): il ne faut pas croire que dans ce dernier cas le dépôt soit plus riche en éléments bacillaires, car c'est le contraire qui a lieu.

Parmi tous les dissolvants qui ont été nommés ce sont l'éther sulfurique et l'alcool méthylique qui produisent la plus forte quantité des bacilles typiques. À cause de cette constatation et par semplicité je viens décrire seulement les expériences faites en dissoudrant le « *phénol bactérien* » avec de l'éther sulphurique.

Pour éliminer le doute que les bacilles précipitants du « *phénol bactérien* », au moment de sa solution en éther sulphurique, fussent ceux mêmes des patines bactériennes restés, dans leur état primitif mais en solution invisible, ou bien qu'ils fussent des bacilles reconstitués par les partigènes déjà disperses et dissous dans le phénol, j'ai répété avec l'éther les expériences faits auparavant avec l'eau et le « *phènol bactérien* » normal, acide, et alcalin et avec le *éhénol bactérien* acidifié d'abord et alcalinisé ensuite.

Tous les résultats obtenus concordent avec ceux fournis par les expériences de dissolution dans l'eau: ces résultats furent constants et démonstratifs d'une façon parfaite.

a) Une anse d'hydrate d'ammonium concentré ajoutée à 1 cc. de « *phénol bactérien* », avant de le dissoudre dans l'éther, permet d'observer une quantité plus forte de bacilles a. r. dans le dépôt.

b) Deux ou trois petites anses d'acide sulfurique au 10% accélérent la floculation mais il n'est pas possible de trouver un seul bacille. Même les granulations a. r. sont très rares dans le dépôt et dans le liquide il n'y a que des substances amorphes acido résistantes.

c) En ajoutants à 1 cc. de *phénol bactérien* une seule anse d'acide sulfurique au 10% et en dissoudrant, quelques minutes après. avec un volume double d'éther, en séparant le dépôt (par centrifugation à la main) et en faisant les préparés, on y trouve une grande quantité de bacilles isolés et en amas, des quels, parmi les bacilles a. t. tipyques, un certain nombre ne démontrent qu'une acido résistance partielle.

Si après 3-4 heures de repos à la température de l'ambient on refait

des préparés avec ce dépôt on remarquera que les bacilles acido résistants ont presque totalement disparu.

d) En introduisant dans cette éprouvette deux petites anses d'hydrate de sodium au 10%, qui suffit à donner au liquide une réaction légèrement alcaline, en agitant, en centrifugeant à la main quelques minutes après et en faisant un préparé avec le dépôt obtenu, on retrouvera un grand nombre de bacilles a. r. Il faut prendre soin de ne point chauffer trop la fuchsine carbolique.

e) Si l'on alcalinise, en proportion, le liquide des éprouvettes où, avant la précipitation avec de l'éther, on avait ajouté 3 ou 4 anses d'acide sulfurique au 10% et dont le précipité examiné de suite après sa formation n'avait laissé voir aucun bacille acido résistant, on remarquerâ qu'à peine l'alcali y est introduit il se sépare une nouvelle abondante floculation de l'éther phénolé: dans les préparés obtenus avec ce dépôt il n'est pas possible d'observer aucun bacille a. r.

Ceci confirme qu'une réaction neutre ou bien très légérement alcaline (pH = 7-7,3) favorise la formation, dans le précipité, de bacilles a. r.; la réaction acide, au contraire, en empêche la présence.

Une réaction faiblement acide permet de remarquer dans le dépôt, la présence des bacilles qui sont peu a. r. Aussitot qu'on alcalinise opportunemént le liquide les bacilles devient plus a. r.

f) Deux éprouvettes contenant 1 cc. de *phénol bactérien* sont traitées par 3 anses d'acide sulfurique au 10%. Vingt minutes après on ajoute à l'une 2 cc. d'éther sulfurique, on la ferme avec un bouchon et on l'agite: l'autre est traitée avec 5 anses d'hydrate de sodium au 10% et est laissée à la température de l'ambient. Avec le dépôt de la première de ces éprouvettes on fait des préparés.

Après un laps de temps de 20 minutes, on traite la deuxième éprouvette, celle alcalinisée, comme la première.

L'examen laisse remarquer un grand nombre de bacilles a. r. dans les préparés du dépôt du phénol bactérien qui, áprès avoir été traité par l'acide, fut alcalinisé: mais aucun bacille ne se trouve dans les préparés du phénol bactérien précipité à l'état acide.

On confirme ainsi l'hypothèse d'une dispersion des colloïdes bacillaires dans le « phénol bactérien »: lorsqu'on dissout le phénol dans l'éther les corps bacillaires se forment de nouveau, si la reaction est légérement acide, neutre, ou bien légérement alcaline, tandis que dans un ambiant fortement acide (ou même très alcalin, comme Dessy l'a observé) *les colloïdes précipitent d'une façon désordonnée en masses sans formes.*

Ce n'est qu'en ce sens qu'on peut expliquer les résultats de toutes ces expériences.

Même si les bacilles se trouvent parfaitement conservés dans le « *phénol bactérien* », comme Puntoni a prétendu de démontrer, si quelques gouttes d'acide dilué peuvent en déterminer la disparition, il faut au moins admettre que dans le « *phénol bactérien* » traité par l'acide, les corps bacillaires sont détruits, dissous. En suite, si en neutralisant simplement avec de la soude, il est possible d'y retrouver les corps bacillaires, il faut par force se convaincre qu'au sein du même « *phénol bactérien* » il se produit un mouvement réversible de dispersion et d'aggrégation des antigènes partiaux des corps bacillaires, selon les variations de la réaction.

g) Les corps bacillaires que l'on observe dans le « *phénol bactérien* » dissous par l'éther, sont caractérisés par une labilité particulière, parfaitement égale à celle des bacilles acido résistants précipités du « *phénol bactérien* » dissous dans l'eau. En effet, en couvrant le dépôt obtenu par 1 cc. de « *phénol bactérien* » précipité avec 2 cc. d'éther, avec quelques cc. d'eau en l'émulsionnant et en le séparant nouvellement par centrifigation à la main, dans ce dépôt ainsi lavé on retrouvera encore plusieurs bacilles acido résistants. Mais si l'on suspend ce dépôt dans 2 cc. d'acide sulfurique au 0,5 : 100 et si l'on en fait les préparés on ne rencontrera que très rarement des bacilles a. r.

Ce fait démontre la cohésion instable des partigènes qui se sont réunis « in vitro » en reformant les corp bacillaires.

h) La recherche des bacilles a. r. du « *phénol bactérien filtré* » exige une technique exacte et très soigneuse:

On ajoute à 1 cc. de « *phénol bactérien filtré par Chamberland* L_2 » (il vaut mieux que la filtration ait eu lieu quelques jours auparavant) une petite anse de NH_4OH et ensuite, successivement, 5 cc. d'éther sulfurique et 1 cc. d'eau distillée. On agite énergiquement et on laisse en repos pendant quelques jours. À l'aide d'un siphon on éloigne le liquide éthéré et on fait les préparés avec le matériel qui surnage sur l'eau et qui se trouve sur le fond de l'éprouvette. Il faut recueillir ce matériel avec grand soin car il adhére souvent au parois de l'éprouvette ce qui oblige à le râcler.

Il faut aussi un certain degré d'habileté pour le répandre sur la lame d'une façon uniforme. Il est bon, en ce cas, de chauffer légèrement la lame même.

Pour la coloration, voyez les conseils donnés dans la 2.ème Communication.

Puntoni rappelle (1) les résultats négatifs que Ninni et Tsui (2) ont

(1) Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microb., fasc. VI, 1932, pag. 164.
(2) C. R. de la Soc. de Biol. (séance du 21 mai 1932, T. CX, pag. 173).

obtenus au cours d'expériences de contrôle à une démonstration sur la reconstitution « *in vitro* » des bacilles tuberculeux dans les filtrés traités avec du phospate de calcium (1). J'ai déjà fait observer que ces savants se sont trompés en suivant mon processus (2). En effet ils ont chauffé les filtrés à 70°, tandis que je ne les chauffe qu'à 65°, et au lieu de répandre un peu de sérum frais de cobaye sur les préparés préalablement séchés, (dans le but de retenir parmi les albuminèes les corps bacillaires et empêcher qu'ils se détachent après la fixation lorsqu'on procéde à leur coloration), ils ont ajouté le sérum au filtré au moment de le précipiter en s'exprimant à tort; « Petragnani affirme que le sérum de cobaye favorise la reconstitution des micelles des corps bacillaires ».

En opérant de cette façon ils ne pouvaient obtenir que résultats negatifs.

Dans la même communication (pag. 162) Puntoni écrit: « Si l'on observe le ph. b/ à l'agglutinoscope, on constate que la masse bacillaire forme une dense suspension de flocons devenus presque transparents qui, à l'ultramicroscope, présentent en général l'aspect granuleux caractéristique des b. tuberculeux en champ obscur. On n'a donc pu constater l'indifférence optique affirmée par Petragnani ».

Si Puntoni, en suivant les bonnes régles de la recherche expérimentale, avait fait le contrôle voulu sur le phénol pur (pour toutes mes expériences je me suis servi de flacons originaux de phénol cristallisé Merck) il aurait ainsi évité une méprise dont il s'est servi pour sa démonstration afin de démolir le phénomène en question: dans ce but il s'est lancé à faire des recherches avec des cires (cire de cornauba) dans l'ineffable préoccupation que nous nous fussions trompés en lisant, dans nos préparés, comme bacilles des formations artificielles de lipoïdes et de cire... !

Observations à l'agglutinoscope et à l'ultramicroscope. —

i) Si l'on introduit dans une éprouvette, parfaitement propre, à sérologie, du phénol pur cristallisé et on le rend liquide en y ajoutant la quantité minima nécessaire d'eau distillée, et si l'on observe à l'agglutinoscope on remarquera une suspension très épaisse de corps floconneux réfrangeants.

On remarque le même phénomène en mettant à l'agglutinoscope une éprouvette de « *phénol bactérien* » seul, centrifugé ou bien centrifugé et filtré par Chamberland L_2 (3).

l) En examinant le même phénol pur à l'ultramicroscope on ob-

(1) Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microb., fasc. I et II, 1932.
(2) Communication à la R. Acc. dei Fisiocritici di Siena, à la séance du 27 mai 1932.
(3) Il faut croire que Puntoni n'a pas fait ces observations avec le « phénol bactérien brut » où l'on aperçoit très bien à l'oeil nu les flocons.

serve des éléments bactériformes homogénément réfrangeants, isolés ou bien à groupes, et présentant toujours le même type même dans des échantillons de provenance différente. Ces corps, avec la même fréquence, on peut aussi les observer dans le « *phénol bactérien centrifugé* » et dans celui filtré par Chamberland L_2 (1).

Ces échantillons de phénol pur qui, examinés à l'agglutinoscope et à l'ultramicroscope, permettent d'observer les formations sus-dites, lorsqu'ils sont dissous dans de l'eau, de l'éther sulfurique, de l'acétone etc. ne deviennent, comme il est naturel, nullement troubles et ne donnent lieu, par conséquent, à aucun dépôt.

Conclusion. — Les recherches décrites ci-dessus mettent hors de doute que dans le « *phénol bactérien* » centrifugé à 3700 tours pendant une heure et même filtré par une bougies poreuse L_2, ils se trouvent des éléments capables de faire apparaitre les bacilles a. r. dans les suspensions d'eau, d'éther sulfurique, d'alcool méthylique, d'acétone, de benzol, de xylol etc.

En analysant expérimentalement ce phénomène il en est résulté que l'hypothèse suivante semble toujours plus fondée: c'est à dire que l'apparition de ces bacilles doit dépendre de la réunion des colloïdes des corps bacillaires qui se trouvent à l'état de *sol* dans le « *phénol bactérien* ».

Le mouvement des différents antigènes partiaux d'où se produit la recomposition des corps bacillaires originaires est réglé par la réaction (de l'ambient): une valeur du pH nettement acide s'oppose à la réapparition des corps bacillaires, qui est au contraire favorisée par une réaction neutre ou bien légérement alcaline.

Ce phenomène, très intéressant, du côté spéculatif, pour la biologie, l'est tout autant pour l'étude des partigènes constituants le b. tuberculeux. Il est ainsi démontré que le « *phénol bactérien* », rendu particulièrement acide et dissous ensuite par un quelconque des dissolvants du phénol, donne lieu à une flocculation produite uniquement par les parties protéiniques du corps bacillaire (nucléo-protéides), tandis que les cires et les lipoïdes restent dispersés dans le liquide dissolvant. Les premières peuvent être séparées et lavées par centrifugation, et les cires et les lipoïdes le sont par évaporation, dialisation, etc.

Ces études nous ont révélé un aspect particulier du phénol liquide lorsqu'il est examiné à l'agglutinoscope et à l'ultramicroscope. C'est ce

(1) À la séance publique du 28 juillet dernier de la R. Acc. dei Fisiocritici de Sienne, en communiquant les résultats de ces expériences, j'ai fait examiner l'acide phénique pur à l'agglutinoscope et à l'ultramicroscope parmi d'autres démonstrations sur le « *phénol bactérien* ».

fait qui a trompé Puntoni le quel, en examinant le « *phénol bactérien* » a pris pour des bacilles ou des amas de bacilles les flocons observés à l'agglutinoscope et les éléments, uniformément réfrangeants, isolés ou bien réunis de façon à former des petites masses de granules cocco-bacillaires que l'on remarque, à l'ultramicroscope, en observant un échantillon quelconque de phénol pur (1).

Dans le but de faciliter aux savants le contrôle de mes expériences, je mets à disposition de dix Directeurs d'Instituts biologiques (des la première dixaine qui en fera demande) 10 fioles de 10 cc. chacune du même « *phénol bactérien* » qui m'a servi pour les experiences sus-décrites, et dont il me reste encore 100 cc. à peu près.

La seule condition est que chacun d'eux publie en tous cas les résultats de ses recherches.

Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Siena.

(1) Dans mes communications précédentes j'ai parlé de l'homogénéité optique du « *phén. b.* » observé seulement au microscope en champ clair.

PAULI P. – A propos d'un procédé facile pour la conservation des microrganismes à l'état de vie latente.

La possibilité de maintenir les microrganismes vivants pendant une longue période de temps a été un des buts les plus importants que plusieurs bactériologues ont poursuivi en obtenant des résultats tantôt satisfaisants, tantôt négatifs.

Les nombreux procédés que les différents rechercheurs ont préconisés peuvent être divisés en deux groupes: le premier, qui s'appuie sur le principe d'empêcher le desséchement du substratum sur lequel on garde les microrganismes (Soyka et Kral, Eisenberg, Martini, Kiefer, Busson, Hauser, Löwi, Müller, Czaplewski, Ungermann, Michael, Dikomeit); le deuxième groupe qui, par contre, est basé sur le desséchement des microrganismes mêmes (Heim, Neufeld, Swift, Otten).

Le procédé que j'ai suivi dans mes recherches appartient justement à ce deuxième groupe et il se détache de la méthode de Swift et de Otten par quelques modifications de technique et par les résultats tout à fait satisfaisants.

Ce sont deux les points essentiels à suivre pour obtenir une bonne conservation des microrganismes à l'état de vie latente lorsqu'on emploie la méthode du desséchement. Les voici: une déshydratation complète

et rapide des microrganismes et l'éloignement de l'oxygène atmosphérique.

Le procédé technique que j'ai suivi pour le desséchement et la conservation des microrganismes varie suivant qu'il s'agit de germes aérobies, d'anaerobies, de virus filtrants et de protozoaires.

On ensemence en surface les bactéries aérobies sur des tubes d'agar incliné et on les laisse à l'étuve jusqu'à la formation d'un abondant enduit cultural; celui-ci doit être repris à l'aide de 5 cmc. de sérum normal de cheval et ensuite réparti stérilement en des quantités de 0,5 cmc. dans de petites éprouvettes stériles (longueur 12 cm.; diamètre cm. 0,8) bouchées par un tampon d'ouate. Après cela on porte les petites éprouvettes dans un essicateur en vacuum (mieux encore dans un appareil de Majmone) contenant de l'anhydride phosphorique; on y fait le vide (2-5 mm. de Hg.) moyennant une pompe et on laisse le tout à la température ambiante où à celle du thermostate jusqu'à ce que le contenu des petites éprouvettes soit totalement desséché. A ce point on enlève es petites éprouvettes de l'essicateur, en les fermant ensuite dans le vide à la flamme.

La différence essentielle de ce procédé, vis-à-vis des autres (Swift et Otten) consiste en ce que, suivant cette méthode, on suspend les bactéries dans le sérum et qu'on garde sous vacuum le résidu sec. L'emploi du sérum n'a d'autre rôle que celui d'incorporer les germes en les isolant le mieux possible, du résidu de l'oxygène qui se trouve dans les petites éprouvettes et de faciliter l'ensemencement. En effet, il suffit de vers stérilement dans un tube de bouillon le contenu sec d'une de ces petites éprouvettes, pour obtenir un développement rapide et sûr de la souche ensemencée.

Le sérum de cheval c'est tout ce qu'il y a de plus approprié pour atteindre ce but, exception faite pour la conservation du b. influentiae du b. tussis convulsivae, du m. *intracellularis*, le m. gonorrhoeae et du m. catarrhalis, envers lesquels il montre un certain pouvoir lytique. Dans ces cas l'on peut utiliser du liquide ascitique, ou du blanc d'oeuf, ou bien de la gélatine stérile.

Pour être bref, je vais rapporter ici la note des germes aérobies conservés, l'époque du desséchement et la date de l'épreuve de la vitalité des germes mêmes.

Souche	Date du desséchement	Date de l'épreuve de vitalité
Strept. pyogenes	Décembre 1926	Février 1932
» haemolyticus	Février 1927	» »
» mucosus	Décembre 1926	» »
» viridans	» »	» »
» acidi lactici	Mars 1928	» »
Diplococcus pneumoniae	Décembre 1926	Avril »
Sarcina tetragena	Décembre 1926	» »
» aurantiaca	Octobre 1927	» »
Microcr. intracellularis	Novembre 1929	Avril »
» gonorrhoeae	» »	» »
» catarrhalis	» »	» »
» pyogenes α	Décembre 1926	Février »
» » β	» »	» »
» » γ	» »	» »
Bact. influentiae	Novembre 1929	Avril »
» tussis convulsivae	» »	» »
Brucella melitensis	Février 1927	Février »
» abortus	» »	» »
Bact. septicaemiae haemorrhagicae	Mars 1928	» »
» pestis	Février 1927	» »
» mallei	Mars 1928	Avril »
» dysenteriae (Shiga-Kruse)	Février 1927	» »
» » (Flexner)	» »	» »
» pneumoniae	» »	» »
» typhi	» »	» »
» cholerae suum	» »	» »
» enteritidis	» »	» »
» coli	Décembre 1926	Février »
» prodigiosum	» »	Avril »
» pyocyaneum	» »	» »
» erysipelatos suum	Février 1927	» »
» vulgaris	Décembre 1926	Février »
» proteus X 19	» »	» »
Vibrio cholerae	Février 1927	» »
Bacillus anthracis	» »	» »
» subtilis	» »	» »
Corynbact. diphtheriae	» »	» »
Mycobact. tuberculosis	Mars 1928	Avril »

En général le développement de tous ces germes gardés en vie selon cette méthode, a lieu comme s'il s'agissait d'un repiquage commun; il peut arriver parfois que ce développement exige un délai de temps plus long, mais je n'ai jamais constaté aucun échec. La virulence des bactéries ne diminue jamais et parfois l'on a même l'impression qu'elle soit augmentée (morve, charbon, pneumocoque). Les propriétés biologiques générales, telles le pouvoir de fermentation sur les hydrates de carbone, l'agglutinabilité, la production de pigment, la toxicité, etc. restant inaltérées.

***

La technique suivie pour la conservation des germes anaérobies est tout à fait semblable au procédé que j'ai exposé tout à l'heure: mais

ici on remplace l'agar-culture pour le desséchement, par une culture en sérum de cheval. Eu effet l'on ensemence les anaérobies à dessécher dans un tube de Gruber, contenant du sérum de cheval normal que l'on place dans le thermostate en l'y laissant pendant un laps de temps suffisant à obtenir un bon développement; après cela on distribue les germes dans de petites éprouvettes stériles et l'on passe au desséchement.

Voici l'émuneration des bactéries anaérobies conservées:

Souche	Date du desséchement	Date de l'épreuve de vitalité
Bact. Welchii	Avril 1927	Juin 1932
Bac. tetani	» »	» »
» botulinus	» »	» »
» sporogenes	» »	» »
» histolyticus	» »	» »
» putrificus	» »	» »
» Novyi	» »	» »
» Chauvei	Mars 1928	» »

Même pour ce groupe de bactéries la méthode en question s'est démontrée vraiment excellente, surtout si l'on pense que, du simple fait du desséchement, la toxicité et la virulence de toutes les souches ont été considérablement augmentées.

***

Les virus filtrants, représentés toujours par des morceaux d'organe appartenants à des animaux infectés, ont parfaitement toléré le procédé de la déshydratation, en gardant leur pouvoir pathogène inaltéré.

On hâchait finement ces petits morceaux d'organe, puis ou les additionnait d'un volume de sérum d'un animal récepteur pour le virus respectif, et enfin on les desséchait rapidement en vacuum, dans chaque petite éprouvette.

Voici les virus dessechés:

Type	Date du desséchement	Date de l'épreuve de vitalité
Virus de la polymyélite	Novembre 1930	Juin 1932
Virus de la fièvre aphteuse	Septembre 1930	Mai 1932
Virus variolique des boeufs	Juillet 1929	Décembre 1931
Virus variolique des poules	Octobre 1930	Janvier 1932
Virus variolique des pigeons	Décembre 1930	Février 1932
Virus variolique des moutons	Décembre 1929	Décembre 1931

***

Les épreuves de dessèchement des protozoaires se rapportent exclusivement à trois souches de trypanosomes (gambiense, equiperdum et brucei) que l'on avait maintennes en vie moyennant des répiquages successifs dans le cobaye.

À l'aide d'une seringue contenant un cmc. d'éparine (1 : 1000) on aspirait du coeur le sang riche en trypanosomes et, après l'avoir fait découler dans une éprouvette paraffinée, on le laissait sédimenter jusqu'à la formation de trois couches superposées: la plus profonde était formée par des globules rouges; la deuxième par des plaquettes, des leucocytes et nombre de trypanosomes; la troisième efin par le plasma renfermant une quantité modique de trypanosomes. On aspirait alors la deuxième et la troisièeme couche, moyennant des pipettes et, après les avoir placées dans de nombreuses et petites éprouvettes stériles, on les desséchait rapidement en vacuum très fort (0,1 mm. de Hg.); enfin on les fermait en vacuum à la lampe. Le contenu sec de ces petites éprouvettes était nouvellement dissout dans de l'aeu distillée, un an et demi après le dessèchement; ensuite lorsqu'on l'injectait dans le cobaye, l'animal en était régulièrement infecté.

***

Mon court exposé sur les résultats obtenus moyennant le procédé dont il est discours, a mis en évidence qu'il est possible de garder les microrganismes en état de vie latente pendant une très longue période de temps (six ans au moins), et même illimitée peut-être, sans qu'ils perdent aucune de leur propriétés biologiques caractéristiques.

Et il faut remarquer encore que cette résistance particulière des microrganismes n'est pas subordonnée à aucune précaution spéciale pour la conservation, car ni la lumière ni la température de 45° prolongée pendant six mois, peuvent compromettre aucunement leur vitalité.

Ces faits n'ont pas seulement une considérable valeur scientifique, mais ils possèdent aussi toute une série de valeurs pratiques.

Institut Sérothérapique de Milan.

MANNOZZI TORINI L. – **Influence des produits d'excrétion des champignons du sol sur le développement du blé.**

Les expériences que je vais résumer dans cette note préliminaire font part d'une série de recherches sur les champignons du sol commencées, depuis quelques années déjà, dans le laboratoire de Biologie végètale du R. Istituto superiore agrario e forestale de Florence, sous la direction de M. le professeur B. Peyronel.

Le but de mes expériences était d'établir si les champignos qui vivent dans le sol peuvent, par leurs excrétions, influer d'une manière quelconque sur le développement des plantes cultivées. N'ayant cependant pu éxécuter des recherches de quelque étendue que sur la blé, ce n'est que de celles-ci que je parlerai.

Nos connaissances sur la question qui nous occupe sont extrêmement limitées, si bien que Waksman (1) dans son traité de microbiologie du sol, qui est pourtant le plus complet qui existe, n'en fait pas mot. Toutefois Pantanelli (2), depuis 1913, eut le mérite de publier des recherches ayant pour but d'établir « si les champignons qui attaquent les parties souterraines des plantes dans des conditions naturelles de parasitisme peuvent sécréter pendant leur vie des substances nuisibles pour les plantes en quantité telle que, diffusant dans le sol, elles le contaminent jusqu'à une certaine distance de la partie attaquée; oubien laissent ces substances dans la partie infectés même après la mort, de sorte que le sol en soit contaminé pour un certain temps ». Pantanelli arrive à la conclusion que du mycélium des champignons sur lesquels avaient porté ses expériences, oubien de leur milieu nutritif qui, dans des conditions naturelles serait représenté par la partie attaquée de la plante, « peuvent se répandre dans la terre environnante des substances nuisibles qui arrêtent la croissance des racines ou même la germination des graines de plantes similaires ».

Plus récèmment Mercuri (3) a étudié l'action des produits d'éxcrétion et de l'extrait mycélien de *Rosellinia necatrix* sur les racines de la vigne, et De Paolis (4) de *Pythium* sp. sur la germination du blé. Cappel-

(1) Waksman S. A.: *Principles of Soil Microbiology*. Second édition (Baillière, Tindall a. Cox, London, 1931).

(2) Pantanelli E.: *Su l'inquinamento del terreno con sostanze nocive prodotte dai funghi parassiti delle piante* (Rend. R. Acc. Lincei, 22, 1° sem. 1913, pag. 116-120); — *Ancora sull'inquinamento del terreno con sostanze nocive prodotte da funghi parassiti delle piante* (Ibid., pag. 170-174).

(3) Mercuri S.: *Un'esperienza sopra l'azione dei prodotti del ricambio e dell'estratto del micelio di « Rosellinia necatrix » sopra le radici della vite* (Boll. Staz. di Patologia Vegetale di Roma, 1928, pag. 194).

(4) De Paolis C.: *Esperienze sopra l'azione che i prodotti di escrezione e del ricambio di « Pythium sp. » hanno sulla germinazione del grano* (Boll. Staz. Patol. Vegetale di Roma, 1931).

letti (1) a étudié l'action des produits d'excrétion d'une *Rhizoctonia*, isolée des racines mucorhizées d'*Allium roseum h.*, sur la plante hospitalière.

Les auteurs nommés ont limité leurs recherches à des champignons vivant bien dans le sol. mais en parasites des plantes. Scaramella (2), dans un travail tout récent relatant des recherches commencées et exécutées en grande partié dans ce même laboratoire, a étudié l'influence de lignées de *Rhizopus nigricans*, isolées du sol, sur le développement du blé.

Mes recherches personelles ont parté sur une quarantaine d'éspèces isolée de sols agricoles divers, un petit nombre des quelles sont généralement reconnues commes des parasites facultatifs plus ou moins virulents, tandis que la plus grande partié sont considérées comme de simples saprophytes.

Dans une première série d'expériences j'ai étudié l'action des liquides de culture sur le développement du blé depuis la germination jusqu'are vingtième jour.

Dans ce but les champignons en étude étaient cultivés sur bouillon de carottes, pendant un mois et demi, à la température du laboratoire (14°-16° C.); puis le liquide de culture de chaque espèce était séparé, par filtration aseptique, du mycélium et des spores, et 20 cmc. du filtrat étaient introduits dans des boîtes de Petri de 15 cm. de diamètre, contenant chacune trois disques de papier à filtrer et stérilisées. Dans chaque boîte je mettais 10 cariopses de blé soigneusement choisiés, sterilisées dans de l'*uspulun* (chlorophénate de mercure) à 2,5 p. mille et ensuite rincées soigneusement dans de l'eau stérile. Deux boîtes de Petri identiques aux précédentes, mais contenant du bouillon de carottes stérile et deux contenant de l'eau pariellement stérile, servaient de témoins.

Au vingtième jour la longueur des racines et celle de la partie aérienne étaient mesurées, pour déterminer l'effet des escrétions fongiques sur leur développement.

Il est bon de faire noter tout d'abord que sur bouillon de carottes les racines ont un développement beaucoup moindre que sur l'eau distillée: fait auquel on pouvait s'attendre, vu que le bouillon possède une certaine pression osmotique déterminée par son contenu en sucres, acides organiques, sels et autres produits solubles. En effet les racines y atteignirent une longueur moyenne de 40 mm. seulement, tandis que dans l'eau elles mesuraient 141 mm. La différence fut beaucoup moindre dans la partie aérienne, qui atteignit 147 mm. et 167 mm. respectivement.

---

(1) Cappelletti C.: *Sull'azione dei prodotti del ricambio di miceli microizogeni sulle piante ospiti* (Annali di Botanica, 19, 1930).

(2) Scaramella P.: *Sugli enzimi e sulle tossine prodotte dal « Rhizopus nigricans » in rapporto alla loro azione sulla germinazione del grano* (Nuovo Giornale Botanico Italiano, 1931).

En tous cas ni les racines, ni la partie aérienne des plantes élevées sur bouillon de carottes ne présentèrent aucun phénomène pathologique.

Par rapport aux effet produits par leurs excrétions, les espèces en expérience peuvent se diviser en trois groupes:

1° Espèces dont les liquides de culture déterminèrent une réduction de la longueur des racines et de la partie aérienne (1): *Penicillium lividum*, *Sporotrichum* sp., *Aspergillus niger*, *Cunninghamella* sp., *Clonostachys Araucaria*, *Coniosporium* sp., *Sterigmatocystis* sp., *Rhizoctonia* sp. (2), *Cephalosporium* sp. I, *Spicaria* sp., *Stemphylium botrysum*, *Trichoderma* sp. I, *Rhizopus nigricans*, *Alternaria Peglioni*, *Botrytis cinerea*, *Mucor brevipes* ,*Trichoderma* sp. II, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma Koningi*, *Mycelium sterile dematiaceum indet.*, *Mortierella alpina*, *Haplographium penicillioides*, *Penicillium* sp., *Pirella* sp., *Mortierella* sp. I; en tout, 25 espèces. La longueur des racines variait entre 1 mm. avec *Sporotrichum* sp. et 39 mm. avec *Mortierella* sp. I, celle de la partie aérienne entre 77 avec *Pen. lividum*, et 145 avec *Pirella* sp.

2° Espèces dont les liquides de culture déterminèrent une réduction, plus ou moins notable, du développement des racines, mais ne montrèrent aucune action nuisible sur la partie aérienne, qui atteignit une hauteur égale ou même supérieure à celle des témoins sur bouillon de carottes: *Fusarium* sp. I, *Penicillium leucopus* (= *P. glaucum*), *Chlamydosporium* sp., *Fusarium* sp. II, *Fusarium* sp. III, *Torula chartarum*, *Fusarium* sp. IV, *Fusarium* sp. V, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium sp.* VI; 10 espèces en tout. Longueur minima des racines: 21 mm. avec *Fusarium* sp. I et *Clad. Lerbarum*; maxima 36 mm. avec *Toralu chartarum*. Longueur minima de la partie aérienne: 145 mm. avec *T. chartarum*; maxima: 186 mm. avec *Fusarium* sp. VI.

3° Espèces dont les liquides de culture ne montrèrent aucune action nuisible ni sur les racines, ni sur la partie aerienne, oubien une action négligeable: *Mucor* sp., *Mortierella* sp. II, *Fusarium* sp. VII, *Cephalosporium* sp. II, *Absidia spinosa*. Longueur minima: des racines, 38 mm. avec *Mucor* sp., de la partie aérienne, 146 mm., avec la même espèce. Longueur maxima des racines, 45 mm. avec *Fusarium* VII; de la p. aérienne, 186 avec *Absidia spinosa*.

Avec la plupart des espèces du 2.e et du 3.e groupe on observa un

---

(1) Les espèces sont disposées suivant un ordre déterminé par la somme de la longueur moyenne des racines et de celle de la partie aérienne des plantes de blé. Par ex. avec *Penicillium lividum* celles-ci avaient une longueur des racines de 2 mm. et une longueur de la p. aérienne de 77 mm. ,ce qui donne un total de 79 mm.; *Sporotrichum* sp. 1+86 = 87; *Asp. niger* 3+83 = 88, et ainsi de suite jusqu'à *Mortierella* sp. I, 39+140 = = 179.

(2) Espèce isolée de jeunes plantes de *Pinus insignis* par M. Ettore Castellani, élève de notre Institut, qui l'a aimablement mise à ma disposition, ce dont je lui renouvelle ici mes remerciments.

développement de la patie aérienne des plantes supérieur à celui des témoins sur bouillon de carottes et souvent même à celui des temoins sur eau stérile: ce que l'on peut attribuer soit à une action stimulante des produits d'excrétion, soit à une simple dilution de liquide de culture et diminution de la pression osmotique.

Les liquides de culture des espèces du premier et, en moindre degré, du deuxième groupe produisirent des phénomènes pathologiques variés sur les racines qui, avec les espèces les plus toxiques, non seulement étaient rapidement tuées, mais subissaient une dissociation partielle ou totale de leurs tissus. Les poils absorbants s'altéraient les premiers, puis les racines de deuxième ou troisième ordre, et à la fin il ne restait que quelques moignons, oubien un petit nombre de racines tordues, souvent gonflées à leur extrémité, se soulevant parfois comme des échasses de sorte qu'elles ne trempaient plus dans le liquide que par une partie de leur longueur. Elles prenaient une couleur grisâtre, puis généralement brune.

La réduction de développement de la partie aérienne, souvent accentuée, peut s'expliquer soit par l'absorption de produits toxiques, soit par l'altération et la réduction de l'appareil radiculaire.

Dans une seconde série d'expériences je me suis proposé d'établir si les produits d'excrétion de quelques unes des espéces indiquées ci-dessus sont absorbés par la terre et, en cas positif, s'ils communiquent à celle-ci leur action sur le diveloppement du blé.

Une série d'entonnoirs en verre, remplis à moitié avec de la terre argillo-calcaire et couvert, avec des demi-boîtes de Petri, furent stérilisés à l'autoclave. Chaque entonnoir était introduit par sa partie inférieure dans un matras conique destiné à recevoir le liquide de culture filtrant à travers la terre, sur laquelle je le versai avec tous les soins possible d'asepsie. Puis sur la terre même je semai de blé sterilisé comme dans les expériences précedentes. Les liquides filtrés furent introduits dans des boîtes de Petri contenant chacune trois disques de papier à filtre et 10 cariopses sterilisées. Des cultures témoins furent faites en même temps sur terre sterilisée mouillée avec de l'eau et avec du bouillon de carottes, sur bouillon de carottes dans des boîtes de Petri, sur les liquides de culture non filtrés.

A cause de l'appareillage plutôt compliqué exigé par ces expériénces, j'ai dû les limiter à six espèces seulement. On peut les diviser en deux groupes principaux et chacun de ceux ci en deux groupes de deuxième ordre, suivant le schéma suivant:

1° Espèces dont les excrétions nuisibles furent retenues totalement par la terre (de sorte que le filtrat n'était plus toxique):

a) sous une forme non accessible pour les racines, s'est à dire non nuisible pour les plantes de blé élevées sur cette terre: (*Aspergillus niger*

longueur respective des racines et de la partié aérienne: sur le liquide de culture, 4 mm. et 83 mm.; sur terre contaminée, 45 et 220; sur filtrat 43 et 206; sur bouillon de carottes 42 et 142; sur terre mouillés d'eau, 124 et 179);

b) sous une forme accessible et nuisible pour les racines, mais non pas pour la partie aérienne: *Spicaria* sp. (liquide de culture, 16 et 106; terre contaminée 19 et 175; filtrat, 45 et 195; témoins comme pour *Asp. niger*) et *Cladosporium Lerbarum* (liq. de cult., 22 et 180; terre cont., 27 et 225; filtrat, 41 et 210).

2° Espèces dont les excrétions nuisibles furent retenues en partie seulement:

a) sous une forme nuisible pour les racines et pour la partie aérienne: *Cunninghamella* sp. (liq. de cult., 15 mm. et 80 mm.; terre contam. 20 et 85; filtrat, 35 et 114) et *Pirella* sp. (liq. de cult. 30 et 135; terre cont., 30 et 120; filtrat, 39 et 138);

b) sous une forme nuisible pour les racines seulement: *Fusarium* sp. VI (liq. de cult. 35 et 170; terre cont., 39 et 169; filtrat, 40 et 210).

Conclusion. — Des expériences exposées on peut tirer les conclusions suivantes:

1° Un grand nombre de champignons du sol, et précisément le 62,5% des espèces étudiées par moi, sécrètent des produits toxiques pour le blé, déterminant un état de souffrance, suivi de la mort et de la décomposition partielle ou totale, des racines, et un arrêt du développement soit des racines, soit de la partie aérienne.

2° Un nombre moindre, c'est à dire le 25% des espèces étudiées par moi, produisent des excrétions ayant pour effet une résuction du développement des racines, mais non pas de la partie aérienne.

3° Un petit nombre d'espèces, le 12.5% de celles expérimentées, non seulement n'exercent aucune action nuisible par leurs excrétions, mais au contraire quelquesunes d'entre elles semblent plutôt avoir une action stimolante.

4° La terre absorbe tantôt totalement, tantôt en partie les produits d'excrétion des champignons du sol; de ces produits, les uns restent dans le sol sous une forme accessible aux racines, et par conséquent nuisible, les autres sous une forme non accessible, dans les conditions d'expérimentation réalisées.

Laboratoire de Biologie végétale du R. Institut Supérieur agricole et forestier, Florence.

Direttore responsabile: Dr. Prof. A. Zironi.